

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Endres  
und  
Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
Klinikum der Universität  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Einfluss des Transkriptionsfaktors *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) auf die  
Immunzellinfiltration und Chemokinexpression im  
Melanommodell**



Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Celina Alessandra Aithal  
aus Heidelberg  
2021

**Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sebastian Kobold

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Markus Reinholz  
Prof. Dr. Elisabeth Messmer  
Prof. Dr. Ralph Mocikat

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen  
Prüfung: 22.07.2021

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Celina Alessandra Aithal, erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Einfluss des Transkriptionsfaktors *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) auf die Immunzellinfiltration und Chemokinexpression im Melanommodell**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 22.07.2021

.....

Celina Alessandra Aithal

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das maligne Melanom	1
1.2	Die Rolle von MITF in Melanozyten	1
1.3	Die Rolle von MITF in der Melanomentstehung und -progression	2
1.4	Therapie des malignen Melanoms	3
1.4.1	Zielgerichtete Therapien des malignen Melanoms ( <i>targeted therapy</i> )	3
1.4.1.1	Interaktion zwischen MITF und dem MAPK-Signalweg	4
1.4.2	<i>Cancer Immunosurveillance</i> und <i>Cancer Immunoediting</i>	5
1.4.3	Immun-Checkpoint-Inhibition	6
1.4.3.1	Die Rolle von MITF in der T-Zell-Erkennung von Melanomzellen	8
1.5	Die Rolle verschiedener Immunzellpopulationen in der Tumorummunologie des Melanoms	9
1.5.1	Myeloide Zellen	9
1.5.1.1	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>	10
1.5.1.2	Tumor-assoziierte Makrophagen	10
1.5.2	Natürliche Killer-Zellen	10
1.6	Chemokine, Chemokin-Rezeptoren und ihre Rolle in der Tumorthherapie	11
1.7	Ziele dieser Arbeit	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Technische Geräte und Reagenzien	14
2.2	Zelllinien	16
2.3	FACS-/ Westernblot-Antikörper (Klon)	16
2.4	Software	16
2.5	Zelluläre Methoden	16
2.5.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	16
2.5.2	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	17
2.5.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	17
2.5.4	Kultivierung von Tumorzellen	17
2.5.5	Gewinnung von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes	17
2.5.6	siRNA-Transfektion von Tumorzellen	17
2.5.7	Transfektion von Platin-E-/ Platin-A-Zellen	18
2.5.8	Transduktion von Tumorzellen	18
2.5.9	Migrations-Assay	18
2.6	Molekularbiologische Methoden	19
2.6.1	Polymerase-Kettenreaktion	19
2.6.2	Agarose-Gelelektrophorese	19
2.6.3	Klonierung von PCR-Produkten	19
2.6.3.1	Vektoren	19
2.6.3.2	Overlap-Extension-PCR und Primer-Design	19
2.6.3.3	Restriktion	20
2.6.3.4	Ligation	20
2.6.3.5	Transformation	20
2.6.4	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	20
2.6.5	Extraktion zytoplasmatischer Ribonukleinsäure	21
2.6.6	Reverse Transkription	21
2.6.7	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion	21
2.7	Immunologische Methoden	21
2.7.1	Durchflusszytometrie	21
2.7.2	Western Blot	22
2.8	Tierversuche	22
2.8.1	Mäuse	22
2.8.2	Isolation von Splenozyten	22
2.8.3	<i>In vivo</i> -Tumorversuche	22
2.9	Statistik	23

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1	MITF-Überexpression in den humanen Melanomzelllinien WM8 und WM35	24
3.2	MITF-Überexpression in WM8 und WM35 führt zu verringerter Migration von CD14 <sup>+</sup> und CD19 <sup>+</sup> Zellen <i>in vitro</i>	24
3.3	MITF-Überexpression in WM8 und WM35 verändert ihre Chemokinexpression	26
3.4	MITF- <i>knockdown</i> in den humanen Melanomzelllinien WM8 und WM35	27
3.5	MITF- <i>knockdown</i> in WM8 und WM35 führt zu gesteigerter Immunzell-Migration <i>in vitro</i>	27
3.6	MITF- <i>knockdown</i> in WM8 und WM35 verändert ihre Chemokinexpression	29
3.7	MITF-Überexpression in der murinen Melanomzelllinie Yumm1.1	30
3.8	MITF-Überexpression in Yumm1.1 führt zu gesteigerter Immunzellmigration <i>in vitro</i>	31
3.9	MITF-Überexpression in Yumm1.1 steigert ihre CCL5- und CXCL10-Expression <i>in vitro</i>	32
3.10	MITF-Überexpression in Yumm1.1 führt zu gesteigertem Tumorwachstum <i>in vivo</i>	32
3.11	MITF-Überexpression in Yumm1.1-Tumoren führt zu verringerter Immunzellinfiltration <i>in vivo</i>	33
3.12	MITF-Überexpression in Yumm1.1-Tumoren führt zu verringerter Chemokinexpression im Tumorgewebe <i>in vivo</i>	34
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>35</b>
4.1	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	35
4.2	Einfluss von MITF auf die Migration CD14 <sup>+</sup> Zellen in den humanen Melanomzelllinien WM8 und WM35	35
4.3	Einfluss der MITF-Überexpression auf Migration von CD19 <sup>+</sup> Zellen in WM8 und WM35	37
4.4	Einfluss des MITF- <i>knockdown</i> auf Migration von NK-Zellen in WM8 und WM35	37
4.5	Einfluss des MITF- <i>knockdown</i> auf Migration von CD4 <sup>+</sup> Zellen in WM35	38
4.6	Einfluss der MITF-Überexpression auf die Chemokinexpression in WM8 und WM35	38
4.7	Einfluss des MITF- <i>knockdown</i> auf die Chemokinexpression in WM8 und WM35	39
4.8	MITF-Überexpression in der murinen Melanomzelllinie Yumm1.1 führt zu veränderter Chemokinexpression und zur Rekrutierung entsprechender Immunzellen	39
4.9	MITF-Überexpression in Yumm1.1 führt zu unterschiedlichen Effekten <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	41
4.10	Einfluss von MITF auf die Rekrutierung von dendritischen Zellen ins Tumormilieu	42
4.11	Abschließender Ausblick: Einfluss von MITF auf die Immunzellinfiltration von Melanomen	43
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichung</b>	<b>59</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>60</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist eine aggressive Tumorerkrankung, welche aus entarteten Melanozyten hervorgeht. In Deutschland macht es etwa 5 % aller Krebsneuerkrankungen aus, mit weiterhin steigender Inzidenz. Unter den verschiedenen Hautkrebsformen macht das maligne Melanom nur etwa 9 % der Fälle aus, ist jedoch für ca. 77 % der Todesfälle durch Hautkrebs verantwortlich (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2019), was die Wichtigkeit einer Verbesserung der Therapiemöglichkeiten verdeutlicht. Patienten in frühen Stadien der Erkrankung haben nach chirurgischer Exzision häufig eine vergleichsweise gute Prognose, spätere Stadien der Erkrankung zeigen jedoch eine deutlich reduzierte 5-Jahres-Überlebensrate (100 % im *Union internationale contre le cancer* (UICC) Stadium I versus 19 % im UICC Stadium IV, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2019). Als wichtigster Risikofaktor gilt die Exposition gegenüber ultravioletter (UV) Strahlung, welche durch Schädigung der DNA (*desoxyribonucleic acid*) kanzerogen wirken kann und die maligne Transformation von Melanozyten fördert. Ein endogener Mechanismus, um die Haut vor UV-bedingten DNA-Schäden zu schützen, ist die Induktion der Pigmentierung. Dieser Prozess wird maßgeblich von *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) reguliert, einem wichtigen Transkriptionsfaktor der melanozytären Zellreihe, der neben Pigmentierung auch andere essentielle Funktionen in Melanozyten kontrolliert, wie Proliferation und Zellüberleben (Cheli *et al.*, 2010, Levy *et al.*, 2006). In der Erforschung des Verhaltens und der Tumorbilogie von Melanomen wird MITF berechtigterweise besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Im Folgenden soll zunächst die bedeutende Rolle von MITF in Melanozyten und Melanomzellen veranschaulicht werden.

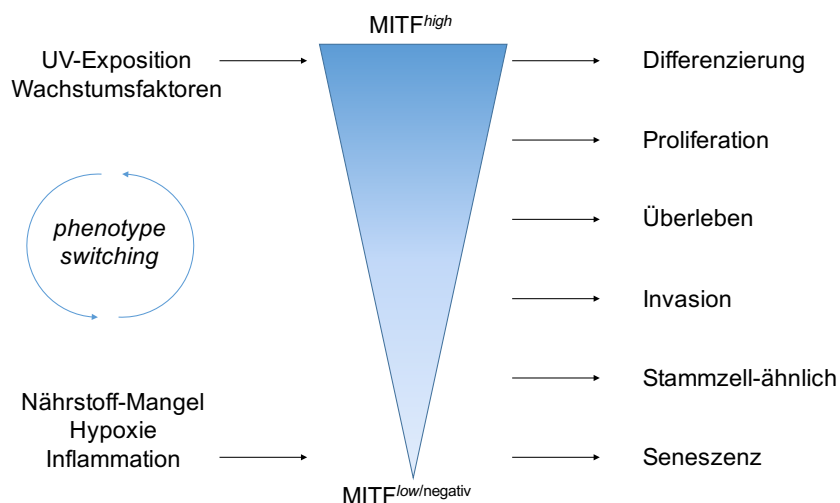
## 1.2 Die Rolle von MITF in Melanozyten

MITF ist ein entscheidender Transkriptionsfaktor der melanozytären Zellreihe mit vielfältigen Funktionen, die bis heute noch nicht vollständig aufgedeckt sind. MITF wird als *master regulator* der melanozytären Zellreihe angesehen und kontrolliert ein breites Spektrum an Aufgaben in Melanozyten, dazu gehören Zellzyklusregulation, Proliferation, Zellüberleben und Pigmentierung (Cheli *et al.*, 2010, Levy *et al.*, 2006). Es existieren verschiedene Transkriptionsvarianten, welche zelltypspezifisch exprimiert werden, die MITF-M-Isoform gilt als melanozytenspezifisch (Levy *et al.*, 2006). Melanozyten kommen in verschiedenen Geweben wie Retina, Innenohr oder Haarfollikeln vor, am besten untersucht sind die Funktionen von MITF jedoch in den Melanozyten der Haut (Cheli *et al.*, 2010). Dort ist MITF dafür verantwortlich, die Toleranz der Melanozyten gegenüber oxidativem Stress und DNA-Schäden bei Exposition gegenüber UV-Strahlung zu regulieren (Liu *et al.*, 2009, Hartman *et al.*, 2015). Durch Regulation von anti-apoptotischen Proteinen kann MITF Melanozyten vor dem Zelltod bewahren (McGill *et al.*, 2002). Es konnte nachgewiesen werden, dass MITF direkt die Transkription melanozytärer Differenzierungsantigene (MDA) reguliert, welche

für den Pigmentierungsprozess benötigt werden, wie Tyrosinase (Yasumoto *et al.*, 1994), Glykoprotein (gp) 100 und *melanoma antigen recognized by T cells 1* (MART-1, Du *et al.*, 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MITF durch direkte und indirekte Modulation von Zellzyklusproteinen sowohl einen Zellzyklus-Arrest als auch eine Progression induzieren kann (Du *et al.*, 2004, Carreira *et al.*, 2005, Carreira *et al.*, 2006, Cheli *et al.*, 2010).

### 1.3 Die Rolle von MITF in der Melanomentstehung und -progression

Die Regulation von Differenzierung, Proliferation und Zellzyklus machen MITF zu einem wichtigen und interessanten Transkriptionsfaktor in der malignen Transformation von Melanozyten. MITF wurde als Onkogen beschrieben, eine Genamplifikation wurde in ca. 20 % humaner Melanome nachgewiesen (Garraway *et al.*, 2005). Eine Keimzell-Mutation, welche den Abbau des MITF-Proteins verhindert, konnte mit dem Auftreten familiärer Melanome assoziiert werden (Bertolotto *et al.*, 2011). Die Rolle von MITF im Melanom ist jedoch nicht ganz eindeutig definierbar, die Funktionen von MITF sind vielfältig und werden weiter durch onkogene Dysregulation und Umwelteinflüsse moduliert. So besteht eine Interaktion zwischen MITF und onkogenem <sup>V600E</sup>BRAF, einem wachstumsfördernden Protein, welches in der großen Mehrzahl von Melanomen gefunden werden kann (s. Kap. 1.4.1.1). Hypoxische Bereiche in Tumoren induzieren eine verminderte MITF-Expression (Feige *et al.*, 2011) und beeinflussen das Metastasierungsverhalten der Tumorzellen (Cheli *et al.*, 2012). Die Expressionslevel von MITF scheinen eine wichtige Rolle hinsichtlich des Phänotyps von Melanomzellen zu spielen, dabei werden MITF<sup>high</sup>- von MITF<sup>low</sup>-Melanomen unterschieden. Carreira *et al.* postulierten ein Rheostat-Modell der MITF-Expression, wonach



**Abbildung 1: MITF-Rheostat- und *phenotype switch*-Modell nach Carreira *et al.*, 2006 und Hoek *et al.*, 2008.** Unterschiedliche MITF-Level vermitteln verschiedene Effekte in Melanomzellen. Hohe Expressionslevel führen zu einem differenzierten Phänotyp und vermitteln Proliferation und Zellüberleben. Melanomzellen mit wenig MITF zeigen einen dedifferenzierten, invasiven Phänotyp mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften. Das Entfernen von MITF aus MITF<sup>high</sup>-Melanomzellen führt zu Seneszenz der Zellen. *In vivo* wie *in vitro* können die Phänotypen durch externe Stimuli und Umwelteinflüsse ineinander umgewandelt werden. Darstellung und Inhalt der Abbildung modifiziert nach Hartman *et al.*, 2015 und Arozarena *et al.*, 2019.

unterschiedliche Expressionslevel von MITF jeweils mit bestimmten Charakteristika assoziiert sind. Demnach vermitteln hohe Expressionslevel von MITF vor allem Proliferation, einen differenzierten Phänotyp und schützen vor Apoptose, während niedrige Level zu einem seneszenten, dedifferenzierten Phänotyp mit vermehrt invasiven Eigenschaften führen (Carreira *et al.*, 2006, s. Abbildung 1). Hoek *et al.* postulierten später das sog. *phenotype-switching*-Modell (oder *phenotype plasticity*). Sie konnten zeigen, dass innerhalb von Melanomen beide Phänotypen nachweisbar sind und Melanomzellen zwischen diesen Phänotypen wechseln können (Hoek *et al.*, 2008, s. Abbildung 1). Melanomzellen mit proliferativem Phänotyp (MITF<sup>high</sup>) waren vor allem am peripheren Rand, Melanomzellen mit invasivem Phänotyp (MITF<sup>low</sup>) vor allem im Zentrum der Tumoren nachweisbar (Hoek *et al.*, 2008, Ahmed *et al.*, 2018). Haass *et al.* konnten außerdem demonstrieren, dass Einflüsse des Mikromilieus wie Hypoxie und Exposition gegenüber *mitogen activated pathway-kinase* (MAPK)-Inhibitoren (s. Kap. 1.4.1) einen Wechsel zwischen den Phänotypen induzieren konnte und dieser reversibel war (Haass *et al.*, 2014). *Phenotype switching* scheint ein wichtiger zugrundeliegender Mechanismus bei erworbener Therapieresistenz gegenüber MAPK-Inhibitoren und Immuntherapien (s. Kap. 1.4.3) zu sein (Arozarena *et al.*, 2019, Bai *et al.*, 2019). Mit MITF als bestimmendem Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Phänotypen wird die entscheidende Rolle dieses Transkriptionsfaktors für die Melanombiologie und -therapie deutlich.

#### 1.4 Therapie des malignen Melanoms

Die Therapie des malignen Melanoms ist vom Stadium bei Diagnosestellung abhängig. In frühen Stadien können viele Patienten durch chirurgische Exzision geheilt werden, bei bestimmten Unterformen oder inoperablen Melanomen kann eine Radiotherapie zum Einsatz kommen. Da das maligne Melanom jedoch häufig metastasiert, wird in vielen Fällen eine systemische Therapie nötig. Die früher angewandten zytostatischen Chemotherapien wurde weitestgehend von neueren Therapieformen abgelöst, große Erfolge wurden durch zielgerichtete Therapien (sogenannte *targeted therapies*, s. Kap. 1.4.1) und Immuntherapie (s. Kap. 1.4.3) erreicht, welche deshalb bereits Einzug in die aktuellen Leitlinien gefunden haben (S3-Leitlinie zu Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, 2019). Im Folgenden sollen diese neuartigen Therapien detaillierter erläutert werden.

##### 1.4.1 Zielgerichtete Therapien des malignen Melanoms (*targeted therapy*)

Die Entdeckung, dass 60-70 % der Melanome die aktivierende V600E BRAF-Mutation aufweisen (Davies *et al.*, 2002), ermöglichte neue Therapieansätze zur Behandlung dieser schnell fortschreitenden Tumorerkrankung. Das RAF-Protein ist Teil der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkette (sog. MAPK-Signalweg), durch welche extrazelluläre Stimuli nach intrazellulär und in den Zellkern



übermittelt werden. Ein wichtiger Effekt dieses Signalwegs ist die Förderung der Zellzyklus-Progression (Wellbrock *et al.*, 2004a). Die <sup>V600E</sup>BRAF Mutation im Melanom induziert eine konstitutive Aktivierung dieses Signalwegs und sorgt so für unkontrolliertes Zellwachstum und Tumorentstehung (Wellbrock *et al.*, 2004b). Grundlage der *targeted therapies* ist es, möglichst gezielt an transformierenden Veränderungen maligner Zellen anzugreifen und so gesunde Zellen besser zu schonen als durch die Gabe konventioneller Zytostatika (Green, 2004). Im Melanom spielen vor allem Inhibitoren des MAPK-Signalwegs eine wichtige Rolle. Dazu zählen BRAF-Inhibitoren (Vemurafenib, Dabrafenib) und MEK-Inhibitoren (Trametinib), die in <sup>V600E</sup>BRAF-mutierten Melanomen gezielt in die ungebremste Aktivierung des MAPK-Signalwegs eingreifen sollen. Große klinische Studien verzeichneten zunächst vielversprechende Erfolge, in welchen das Gesamtüberleben durch die neuen Medikamente verbessert wurde (Chapman *et al.*, 2011, Hauschild *et al.*, 2012, Flaherty *et al.*, 2012). Allerdings zeigte sich bei fast allen behandelten Patienten früher oder später eine Resistenz gegen diese Therapien. Durch die Kombination eines BRAF-Inhibitors (Dabrafenib oder Vemurafenib) mit dem MEK-Inhibitor Trametinib konnte das mediane progressionsfreie Überleben gegenüber einer Monotherapie mit einem BRAF-Inhibitor weiter verbessert werden (Long *et al.*, 2014, Robert *et al.*, 2015), die Krankheitsprogression konnte dadurch zeitlich verzögert, jedoch nicht verhindert werden. Dennoch profitieren viele Patienten stark von BRAF-/MEK-Inhibitoren, weshalb diese zur adjuvanten Therapie von Melanompatienten im *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) 2017 Tumorstadium IIIA-D und IV zugelassen sind (S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, 2019).

#### 1.4.1.1 Interaktion zwischen MITF und dem MAPK-Signalweg

Wellbrock *et al.* konnten zeigen, dass <sup>V600E</sup>BRAF, aber nicht Wildtyp-BRAF die MITF-Expression reguliert (Wellbrock *et al.*, 2008). Die Interaktion zwischen BRAF und MITF ist allerdings komplex, <sup>V600E</sup>BRAF induziert einerseits die Degradation des MITF-Proteins via des BRAF-ERK-Signalwegs (Wellbrock *et al.*, 2005, Wu *et al.*, 2000), andererseits wird der gleiche Signalweg für die Transkription des MITF-Gens benötigt (Wellbrock *et al.*, 2008). Wellbrock *et al.* stellen hierzu die Hypothese auf, dass die von Melanomzellen erworbene Fähigkeit, mittels <sup>V600E</sup>BRAF die Expression von MITF zu kontrollieren, optimale MITF-Protein-Level für Proliferation und Überleben garantieren, einen Zellzyklusarrest und Differenzierung aber verhindern soll (Wellbrock *et al.*, 2008, s. Abbildung 1). Die Komplexität und Dynamik der MITF-Regulation in diesem Kontext wird auch durch Publikationen der Arbeitsgruppe um David E. Fisher deutlich, welche zeigen konnten, dass die Aktivierung des MAPK-Signalwegs zu Phosphorylierungen von MITF führt. Dies verstärkte einerseits die Aktivität von MITF an den Promotoren seiner Zielgene (Hemesath *et al.*, 1998), induzierte aber auch dessen proteasomale Degradation (Wu *et al.*, 2000). Dabei konnte auch gezeigt werden, dass eine S73A/S409A-mutierte, nicht phosphorylierbare Variante von MITF sehr stabil, aber transkriptionell inaktiv ist. Dies weist auf eine funktionelle Kopplung von Aktivität und

Degradation von MITF hin und impliziert damit eine gewisse Dynamik der Regulation von MITF (Wu *et al.*, 2000, Hartman *et al.*, 2015).

Dass die ungehemmte Proliferation von Melanomzellen mit <sup>V600E</sup>BRAF-Mutation von MITF abhängig zu sein scheint, macht die Klassifikation von Melanomen in MITF<sup>high</sup>- und MITF<sup>low</sup>-Phänotypen für *targeted therapies* zu einem interessanten Parameter, welche prätherapeutisch in Betracht gezogen werden könnte. Allerdings finden sich hierzu widersprüchliche Daten in der Literatur, eine Therapieresistenz gegenüber MAPK-Inhibitoren konnte sowohl in MITF<sup>high</sup> Melanomen (Haq *et al.*, 2013, Johannessen *et al.*, 2013) als auch in MITF<sup>low</sup> Melanomen (Konieczkowski *et al.*, 2014, Muller *et al.*, 2014) beobachtet werden. Neue Möglichkeiten lieferte die Entdeckung, dass in Melanomen von Patienten, welche mit MAPK-Inhibitoren behandelt wurden, ein Anstieg an melanozytären Differenzierungsmarkern nachgewiesen werden konnte, welches die Erkennung der Melanomzellen durch das Immunsystem verbesserte (Boni *et al.*, 2010, Frederick *et al.*, 2013). Dies ermöglichte neue Ansätze zur Kombination von *targeted therapies* mit Immuntherapien, welche aktuell bereits in klinischer Erprobung sind (Ribas *et al.*, 2019). Im Folgenden sollen die Grundprinzipien der Interaktion von Tumorzellen und dem Immunsystem, sowie deren Nutzung in der Melanomtherapie dargestellt werden.

#### 1.4.2 *Cancer Immunosurveillance* und *Cancer Immunoediting*

Die Ursprünge der Therapie von malignen Tumoren mithilfe des Immunsystems gehen auf die Ansätze von William B. Coley zurück, der 1893 durch Applikation von abgetöteten Bakterien, bekannt als Coley's Toxin, inoperable Tumoren therapieren konnte (Coley, 1991). Später entstand das Konzept der *Cancer Immunosurveillance*, welches die Rolle des Immunsystems während der Krebsentstehung beschreibt und dessen Fähigkeit, entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren (Burnet, 1971, Thomas, 1982). Später wurde dieses Konzept zum sogenannten *Cancer Immunoediting* erweitert, welches die Interaktion des Immunsystems mit Tumorzellen im Verlauf der Tumorgenese beschreibt und in drei Phasen eingeteilt wird: *Elimination*, *Equilibrium* und *Escape* (Dunn *et al.*, 2002).

Die Eliminationsphase entspricht weitestgehend dem ursprünglichen Konzept der *Immunosurveillance*. In dieser Phase überwiegt die Zerstörung der Tumorzellen durch das Immunsystem und die Entstehung einer manifesten Krebserkrankung wird verhindert. Dem Übergang in die Equilibriums-Phase legen die Autoren eine Art darwinistische Selektion zugrunde: während ein Teil der Tumorzellen durch das Immunsystem zerstört werden kann, entstehen zufällig neue Tumorzellen, welche durch den Selektionsdruck des Immunsystems resistenter gegen dessen Angriffspunkte sind und sich deshalb durchsetzen. Hierbei spielen genetische Instabilität und die Heterogenität der Tumorzellen eine wichtige Rolle (Dunn *et al.*, 2004). Die Equilibriums-Phase kann

über Jahre andauern, die Immunkompetenz des Patienten wird von den Autoren als ausschlaggebender Faktor angesehen, wie lange das Gleichgewicht zwischen Tumorzellentstehung und -zerstörung gehalten werden kann (Dunn *et al.*, 2004). Verschiedene Mechanismen ermöglichen es den überlebenden Tumorzellen, der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Dazu zählen vorrangig der Verlust der Zielstrukturen, welche durch das Immunsystem erkannt werden, die Induktion und Aufrechterhaltung eines immunsuppressiven Tumormilieus und die Modulierung Tumorzell-intrinsischer Signalwege zugunsten des Tumorzellüberlebens (Khong *et al.*, 2002). Überwiegen diese Mechanismen erfolgt der Übertritt in die Escape-Phase, die Tumoren können weitestgehend ungehindert wachsen und werden klinisch manifest (Khong *et al.*, 2002, Dunn *et al.*, 2004).

Im Melanom konnten die ersten Erfolge einer Art systemischen Immuntherapie durch direkte Injektion des attenuierten Mykobakteriums *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) beobachtet werden. Die dadurch erzielte unspezifische Stimulation des Immunsystems führte zur Regression der BCG-injizierten wie auch der nicht-injizierten Tumoraläsionen der Patienten (Morton *et al.*, 1974). Später konnte gezeigt werden, dass eine Hochdosistherapie mit systemisch appliziertem Interleukin (IL)-2 in Melanompatienten ebenfalls zu einem systemischen Therapieansprechen führte (Atkins *et al.*, 1999). IL-2 sollte dabei als Wachstumsfaktor für T-Zellen dienen, die Nebenwirkungen dieser Therapie sind allerdings häufig und vergleichsweise schwerwiegend. Einen großen Durchbruch in der Immuntherapie von Tumoren erbrachten die sogenannten Immun-Checkpoint-Inhibitoren, deren erfolgreiche Anwendung erstmals im Melanom demonstriert wurde (Hodi *et al.*, 2010, Brahmer *et al.*, 2012, Topalian *et al.*, 2012). Auf diese soll im Folgenden näher eingegangen werden.

#### 1.4.3 Immun-Checkpoint-Inhibition

Unter Immun-Checkpoint-Inhibitoren versteht man in der Regel monoklonale Antikörper, welche die Oberflächenproteine *programmed cell death protein 1* (PD1), *programmed cell death protein ligand 1* (PDL1) oder *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA4) binden. Diese Proteine sind Teil der endogenen Kontrolle des Immunsystems, überschießende Immunantworten zu unterbinden. Für eine T-Zell-Aktivierung sind klassischerweise zwei Signale nötig: (1) Bindung des *major histocompatibility complex* (MHC)-Antigen-Komplex an den T-Zell-Rezeptor (TZR) der T-Zelle, und (2) Kostimulation durch Bindung von B7-H1/H2 (*cluster of differentiation* (CD) 80/86) an CD28 auf T-Zellen. Sobald eine T-Zelle aktiviert ist, exprimiert sie PD1, welches an PDL1 binden kann, was eine Inhibition der Signalweitergabe *downstream* des TZR zur Folge hat, und somit Signal 1 aufhebt (Havel *et al.*, 2019). CTLA4 wird von T-Zellen exprimiert und konkurriert mit CD28 um die Bindung an B7-Proteine und inhibiert so eine kontinuierliche Stimulation durch Signal 2. CTLA4 hat dabei eine deutlich höhere Affinität zu B7-H1/H2 als CD28 (Havel *et al.*, 2019, s. Abbildung 2).

Durch die UV-Exposition, welcher Melanozyten sehr stark ausgesetzt sind, akkumulieren diese viele somatische Mutationen, was sich in der überdurchschnittlichen Mutationslast von Melanomen widerspiegelt (Walia *et al.*, 2012). Dadurch entsteht ein breites Spektrum an immunogenen Tumor-assoziierten Neoantigenen, welche von T-Zellen erkannt werden (s. Kap. 1.4.3.1, Lennerz *et al.*, 2005). Damit mutationstragende Melanozyten von T-Zellen toleriert werden, exprimieren diese bereits PD-L1 und B7, binden damit an PD1 und CTLA4 und induzieren so eine Immuntoleranz (Byrne *et al.*, 2017). Melanozyten sind also bereits besonders spezialisiert, einer Immunantwort zu entkommen, und Melanomzellen machen sich diese regulatorischen Checkpoints zunutze. Die Anwendung von Checkpoint-Inhibitoren kann dementsprechend die in Melanomen prominente Dämpfung der T-Zell-Antwort besonders effektiv aufheben (Byrne *et al.*, 2017, Havel *et al.*, 2019).

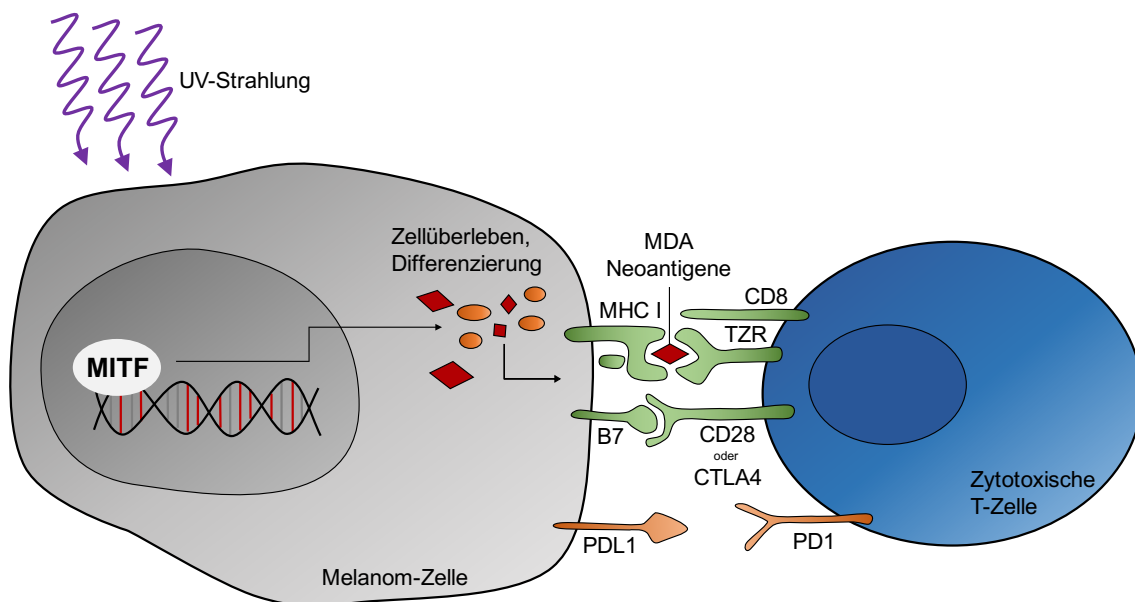
Ein entscheidender Schritt gelang Hodi *et al.* in einer bahnbrechenden Phase III-Studie mit dem monoklonalen Antikörper gegen CTLA4, Ipilimumab. Insgesamt 676 Patienten mit fortgeschrittenen, vorbehandelten Melanomen wurden mit Ipilimumab alleine oder in Kombination mit einer gp100-Vakzine behandelt, als Kontrollgruppe dienten Patienten, welche nur die gp100-Vakzine erhielten. Patienten, welche mit Ipilimumab behandelt wurden, mit oder ohne gp100-Vakzine, zeigten ein deutlich verbessertes medianes Gesamtüberleben von 10,0 Monaten in der Kombinationsgruppe und 10,1 Monaten bei Patienten, die nur Ipilimumab erhielten, versus 6,4 Monate in der Kontrollgruppe (Hodi *et al.*, 2010). Mit der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen PD1 (Nivolumab, Pembrolizumab) konnten weitere Erfolge erzielt werden. Die Therapie mit Pembrolizumab (Robert *et al.*, 2015) oder Nivolumab (Larkin *et al.*, 2015, Wolchok *et al.*, 2017) zeigte eine weitere Verbesserung des Gesamt- und progressionsfreien Überlebens gegenüber Ipilimumab. Pembrolizumab zeigte weniger immunbedingte unerwünschte Nebenwirkungen (s.u.) als Ipilimumab (Robert *et al.*, 2015). Auch Kombinationstherapien mit Nivolumab plus Ipilimumab konnten das Gesamtüberleben signifikant verbessern, bei tolerablen immunbedingten Nebenwirkungen (Wolchok *et al.*, 2017). 2019 fanden Checkpoint-Inhibitor-Therapien Einzug in die awmf-Leitlinie zur adjuvanten Therapie von Melanompatienten im AJCC 2017 Tumorstadium IIIA-D und IV (S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, 2019).

Mit den herausragenden Erfolgen dieser neuartigen Immuntherapien wurden auch neuartige immunbasierte Nebenwirkungen (*immune related adverse events*, irAE) festgestellt. Diese können jedes Organ oder Gewebe betreffen und sind in Häufigkeit und Schwere interindividuell sehr unterschiedlich. Eine retrospektive Studie, welche das Auftreten von irAE unter Nivolumab-Therapie untersuchte, zeigte, dass 49 % der Patienten potentiell immunbasierte Nebenwirkungen zeigten, unter diesen waren die Haut, sowie das gastrointestinale, endokrine und hepatische System am häufigsten betroffen (Weber *et al.*, 2016). Die genauen pathophysiologischen Mechanismen, welche den irAE zugrunde liegen, sind noch nicht im Detail bekannt. Aufgrund des

Wirkungsmechanismus der Checkpoint-Inhibitoren wird jedoch angenommen, dass normalerweise unterdrückte Immunantworten gegenüber gesundem Gewebe nun ebenso wie die antitumorale Immunantwort disinhibiert werden und dabei sowohl T-Zellen als auch Antikörper und Zytokine involviert sein können (Postow *et al.*, 2018).

#### 1.4.3.1 Die Rolle von MITF in der T-Zell-Erkennung von Melanomzellen

Melanome nehmen in gewisser Weise eine Sonderrolle in der Tumorbilogie ein, da sie aus Melanozyten hervorgehen, welche mehr als andere Zellen kanzerogenen Einflüssen ausgesetzt sind. Die Exposition zu UV-Strahlung, welche zu DNA-Schäden führen kann, muss bis zu einem gewissen Grad toleriert werden, damit Melanozyten nicht unverhältnismäßig schnell zugrunde gehen. Eine Transformation in maligne Zellen muss aber verhindert werden, was eine Erkennung von onkogenen DNA-Schäden voraussetzt. MITF ist hier ein essentieller Mediator: DNA-Schäden, welche durch UV-Strahlung ausgelöst werden, stehen am Beginn der Signalkette, durch welche die MITF-Expression induziert wird. MITF leitet daraufhin einerseits den Pigmentierungsprozess ein und schützt die Zellen außerdem durch Aktivierung von *survival*-Programmen vor Apoptose (Byrne *et al.*, 2017). Einige der von MITF regulierten MDA konnten bereits als immunogene Tumorantigene identifiziert werden, welche im Rahmen einer anti-tumoralen Immunantwort von T-Zellen erkannt



**Abbildung 2: Die Rolle von MITF in der T-Zell-Erkennung von Melanomzellen.** Melanozyten und Melanomzellen enthalten überdurchschnittlich viele Mutationen, da sie konstant der DNA-schädigenden UV-Strahlung ausgesetzt sind. Diese DNA-Schäden induzieren die Expression von MITF, wodurch Prozesse wie Zellpigmentierung und -Überleben eingeleitet werden. Auch Gene, deren Transkription von MITF reguliert wird, sind wahrscheinlich von DNA-Schäden betroffen und führen so zur Expression und Präsentation von immunogenen Neoantigenen, welche von T-Zellen erkannt werden können. CD, *cluster of differentiation*. CTLA4, *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*. MDA, melanozytäre Differenzierungsantigene. MHC, *Major Histocompatibility Complex*. PD1, *programmed cell death protein 1*. PDL1, *programmed cell death protein ligand 1*. TZR, T-Zell-Rezeptor. Darstellung und Inhalt der Abbildung modifiziert nach Byrne *et al.*, 2017.

werden, z.B. MART-1 (Kawakami *et al.*, 1994, Coulie *et al.*, 1994), Tyrosinase (Topalian *et al.*, 1994) oder gp100 (Kawakami *et al.*, 1994). Da Melanozyten physiologisch einer hohen Dosis DNA-schädigender UV-Strahlung ausgesetzt sind, ist es wahrscheinlich, dass einige der von MITF induzierten Gene, Mutationen beinhalten. Diese veränderten Proteine und entstandenen Neoantigene werden sowohl von Melanozyten als auch von Melanomzellen via MHC-I präsentiert (Abbildung 2, Byrne *et al.*, 2017). MITF ist somit maßgeblich verantwortlich für (1) das bessere Überleben von Melanozyten trotz akquirierter DNA-Schäden (Giuliano *et al.*, 2010, Hartman *et al.*, 2015) und (2) die Expression von MDA als Antwort auf UV-Exposition (s. Kap. 1.1., Byrne *et al.*, 2017). Byrne und Fisher legen daher nahe, dass viele der im Rahmen von Checkpoint-Inhibition erkannten Tumorantigene von MITF reguliert werden. Folglich lässt sich die Hypothese aufstellen, dass eine Veränderung der MITF-Expressionslevel einen Einfluss auf die Tumorzellerkennung durch das Immunsystem haben könnte (Byrne *et al.*, 2017). In diesem Zusammenhang konnte bereits beobachtet werden, dass das Auftreten einer Vitiligo, d.h. der autoimmunen Zerstörung von Melanozyten, unter unterschiedlichen Immuntherapien positiv mit dem Therapieansprechen korrelierte (Teulings *et al.*, 2015, Freeman-Keller *et al.*, 2016, Hua *et al.*, 2016). Weiterhin konnte demonstriert werden, dass der dedifferenzierte MITF<sup>low</sup>-Phänotyp mit einer Resistenz gegenüber Checkpoint-Inhibitor-Therapie korrelierte (Lee *et al.*, 2020).

## 1.5 Die Rolle verschiedener Immunzellpopulationen in der Tumorimmunologie des Melanoms

Im Tumormilieu können regelmäßig verschiedene Immunzellpopulationen nachgewiesen werden. Unterschiedliche Immunzelltypen können dabei nach dem Konzept des *Immunoeditings* sowohl anti- als auch pro-tumorale Effekte vermitteln. Die führende Rolle von T-Zellen in der Tumorbekämpfung wird durch die vielen erfolgreichen T-Zell-basierten Immuntherapien deutlich. Im Folgenden sollen weitere Immunzellen, welche in der Tumorimmunologie eine wichtige Rolle spielen und auch in dieser Arbeit untersucht wurden, kurz besprochen werden.

### 1.5.1 Myeloide Zellen

Unter myeloiden Zellen werden verschiedene Zelltypen zusammengefasst, dazu gehören Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen (DC), Granulozyten und Mastzellen, eine Sonderstellung nehmen myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) ein. Die Rolle von myeloiden Zellen in der Tumorimmunologie ist nicht abschließend geklärt. Ihre Anwesenheit in Tumoren konnte unter bestimmten Umständen mit einem besseren Überleben assoziiert werden (Taskinen *et al.*, 2007, Nakayama *et al.*, 2002), in der überwiegenden Mehrheit der Literatur konnte jedoch das Vorhandensein myeloider Zellen im Tumor mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden (Zhang *et al.*, 2012, Pollard, 2004). Riesenberg *et al.* konnten zeigen,

dass dedifferenzierte MITF<sup>low</sup>-Melanome über ein gesteigertes inflammatorisches Profil verfügten und verstärkt von myeloiden Zellen infiltriert wurden (Riesenberg *et al.*, 2015).

#### 1.5.1.1 *Myeloid-derived suppressor cells*

MDSC werden als unreife Vorläuferzellen angesehen und werden vor allem durch ihre potenten immunsuppressiven Eigenschaften charakterisiert (De Palma *et al.*, 2013). Durch kontinuierliche niedrigschwellige Dauerstimulation, wie sie im Kontext von Tumoren und chronisch-entzündlichen Erkrankungen typisch ist, wird ihre phagozytische und sekretorische Aktivität beeinträchtigt und sie setzen hauptsächlich anti-inflammatorische Zytokine frei (Bronte *et al.*, 2016).

#### 1.5.1.2 Tumor-assoziierte Makrophagen

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) spielen in der Tumorummunologie eine wichtige Rolle, in vielen Studien konnte eine starke Tumordinfiltration mit TAM mit einem schlechteren Überleben assoziiert werden (Zhang *et al.*, 2012). TAM können in verschiedene Phänotypen klassifiziert werden, welche einen unterschiedlichen Einfluss auf die Tumورprogression haben (De Palma *et al.*, 2013). Sog. M1-polarisierte Makrophagen unterstützen die Tumorbekämpfung durch Rekrutierung von T-Zellen, wohingegen sog. M2-polarisierte, protumorale Makrophagen deutlich häufiger in Tumoren nachweisbar sind (Mantovani *et al.*, 2002, Hamilton, 2008). Sie begünstigen die Tumورprogression durch Generierung eines immunsuppressiven Tumormilieus (Biswas *et al.*, 2006), in verschiedenen Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass TAM gezielt die T-Zell-Aktivierung im Tumor inhibieren (Kryczek *et al.*, 2006, Kuang *et al.*, 2009).

Im humanen System werden CD14<sup>+</sup> myeloide Zellen als die Vorläufer von TAM angesehen (Qian *et al.*, 2011, Olingy *et al.*, 2019). Auch im Blut zirkulierende CD14<sup>+</sup> myeloide Zellen scheinen eine Rolle zu spielen, jedoch sind die Daten hierzu nicht eindeutig: Eine erhöhte Anzahl von zirkulierenden CD14<sup>+</sup> klassischen Monozyten in Melanompatienten vor Beginn einer anti-PD1-Therapie konnte in einer Studie mit einer primären Therapieresistenz assoziiert werden (Pirozyan *et al.*, 2020). Krieg *et al.* konnten hingegen einen erhöhten Anteil CD14<sup>+</sup> klassischer Monozyten in prätherapeutischen Blutproben der Patienten mit einem besseren Therapieansprechen und Gesamtüberleben korrelieren (Krieg *et al.*, 2018).

#### 1.5.2 Natürliche Killer-Zellen

Zytotoxische T-Zellen und Natürliche Killer (NK)-Zellen sind letztlich die verantwortlichen Zellen, welche Zielzellen zerstören können, weshalb sie für die Tumorthherapie besonders interessant sind (Smyth *et al.*, 2002). NK-Zellen werden zum unspezifischen (angeborenen) Immunsystem gezählt, besitzen keine Antigen-Spezifität und benötigen keine Antigenpräsentation zur Initiierung ihrer

Effektorfunktion. Sie sind Teil der Erstantwort gegen infizierte oder maligne transformierte Zellen (Dunn *et al.*, 2004) und erkennen diese durch Stress- oder Gefahrensignale, welche von diesen Zellen exprimiert werden (Bauer *et al.*, 1999, Diefenbach *et al.*, 2001). Eine Besonderheit von NK-Zellen ist es, auch solche Tumorzellen erkennen und töten zu können, welche die Expression von MHC-Molekülen, möglicherweise durch Selektionsdruck, verloren haben (sog. "*missing self*", van den Broek *et al.*, 1995, Morvan *et al.*, 2016).

## 1.6 Chemokine, Chemokin-Rezeptoren und ihre Rolle in der Tumorthherapie

Immunzellen werden über chemotaktische Zytokine, sogenannte Chemokine, an ihren Effektorort rekrutiert. Durch lokale Gradienten werden die Immunzellen angelockt, welche die passenden Chemokinrezeptoren exprimieren (Griffith *et al.*, 2014). Die Nomenklatur der Chemokin-Liganden und -Rezeptoren leitet sich von ihrer molekularen Struktur ab: abhängig von der Position der ersten beiden N-terminalen Cysteine unterscheidet man CC-, CXC-, CX3C- und XC-Motiv-Chemokin-Liganden und -Rezeptoren (Zlotnik *et al.*, 2012). Die Interaktionen zwischen Chemokin-Liganden und -Rezeptoren ist komplex und häufig redundant: ein Rezeptor kann mehrere Liganden binden, und ein Ligand interagiert häufig mit verschiedenen Rezeptoren (Zlotnik *et al.*, 2012, Abbildung 3).

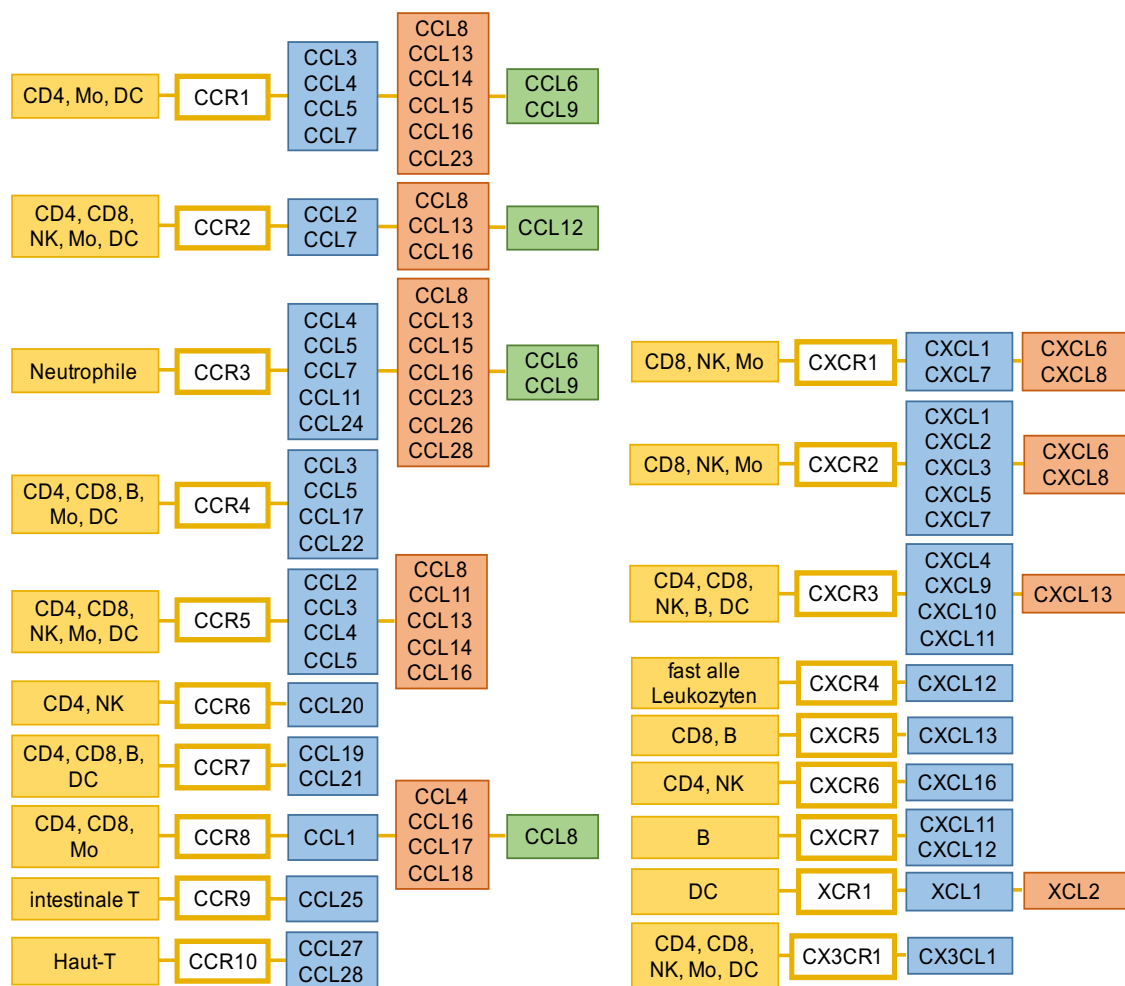
Chemokine galten lange hauptsächlich als Vermittler der Immunzellmigration, mit der Zeit aber konnte ihre Rolle im Tumorwachstum immer besser identifiziert werden. So wurde festgestellt, dass Tumorzellen selbst ebenfalls Chemokin-Rezeptoren exprimieren (Chow *et al.*, 2014). Durch Bindung von Chemokinen an Chemokin-Rezeptoren auf Tumorzellen können diese durch Regulation von Wachstumssignalwegen direkt zum Tumorzellwachstum beitragen und durch Einfluss auf antiapoptotische Proteine deren Zelltod verhindern (Song *et al.*, 2012, Xu *et al.*, 2012). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Expression bestimmter Chemokin-Rezeptoren auf Tumorzellen zur lokalisationspezifischen Metastasierung beiträgt (Payne *et al.*, 2002, Müller *et al.*, 2001, Amersi *et al.*, 2008).

Weiterhin produzieren Tumorzellen selbst Chemokine und interagieren so mit den tumorbildenden Stromazellen (Whiteside, 2008). Chemokine im Tumormikromilieu können sowohl pro- als auch antitumorale Effekte vermitteln. Ohanna *et al.* konnten zeigen, dass ein *knockdown* von MITF in der Zelllinie Mel501 zu einer verstärkten Expression von CCL2 führte, was deren invasive Eigenschaften steigerte (Ohanna *et al.*, 2011). Durch gezielte Expression bestimmter Chemokine können außerdem bevorzugt immunsuppressive Immunzellen wie regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) und MDSC in den Tumor rekrutiert werden (Zou, 2005, Pitt *et al.*, 2016). Zudem können Chemokine die Differenzierung von Immunzellen beeinflussen, was es Tumorzellen ermöglicht, Effektorfunktionen von antitumoralen Immunzellen zu regulieren (Luther *et al.*, 2001, Nagarsheth *et al.*, 2017). Antitumorale Effekte von Chemokinen bestehen hauptsächlich darin, Immuneffektorzellen zu



rekrutieren und die Immunogenität des Tumors zu erhöhen (Nagarsheth *et al.*, 2017, Spranger *et al.*, 2015).

Abhängig vom Ausmaß der Immunzellinfiltration kann man Tumoren einteilen in solche mit starker Immunzellinfiltration (sog. „*hot tumors*“) und solche mit geringer Immunzellinfiltration (sog. „*cold tumors*“). „*Hot tumors*“ zeigen im Allgemeinen ein besseres Ansprechen auf Immuntherapien (Galon *et al.*, 2019). Ein Ansatz in der Verbesserung des Therapieansprechens von „*cold tumors*“ auf Immuntherapien ist es, zu versuchen, diese in „*hot tumors*“ umzuwandeln. Hierfür müssen allerdings die grundlegenden Schlüsselmechanismen noch aufgeklärt werden. Naheliegender ist jedoch, die Hauptregulatoren der Immunzellmigration, Chemokine, und deren Regulation durch die Tumorzellen näher zu betrachten.



**Abbildung 3: Chemokin-Liganden und -Rezeptor-Interaktionen und charakteristische Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren auf Immunzellen im Tumormilieu im humanen und murinen Modell.** CC-/ CXC-/ XC-/ CX3C-Motiv-Chemokin-Ligand (L), bzw. -Rezeptor (R). CD4, CD4<sup>+</sup> T-Zelle. CD8, CD8<sup>+</sup> T-Zelle. NK, natürliche Killer (NK)-Zelle. B, B-Zelle. Mo, Monozyt. DC, dendritische Zelle. T, T-Zelle. Rote und grüne Felder repräsentieren Chemokinliganden-Rezeptor-Interaktionen, welche in humanen (rot) oder murinen (grün) Modellen nachgewiesen wurden. Blaue Felder zeigen Interaktionen, welche in beiden Spezies vorkommen. Darstellung und Inhalt der Abbildung modifiziert nach Nagarsheth *et al.*, 2017 und Griffith *et al.*, 2014.

## 1.7 Ziele dieser Arbeit

Derzeit ist in der Literatur nur wenig über die Interaktion von MITF und dem Immunsystem im Kontext des malignen Melanoms bekannt. Wie oben bereits dargestellt gibt es Hinweise auf eine Interaktion zwischen MITF und der Sekretion bestimmter Chemokine, welche wiederum die Tumordinfiltration bestimmter Immunzellen beeinflussen können (Ohanna *et al.*, 2011, Riesenberg *et al.*, 2015). Eine detaillierte Analyse des Einflusses verschiedener MITF-Level auf die Chemokinexpression von Melanomzellen und Immunzellmigration ist jedoch bisher noch nicht erfolgt.

Vor dem Hintergrund des beträchtlichen Erfolges der Immuncheckpoint-Therapie des malignen Melanoms und den Limitationen dieser Therapiestrategie in „kalten Tumoren“ soll in dieser Arbeit der potentielle Zusammenhang zwischen dem melanozytären „*master regulator*“ MITF und der Immunzellmigration untersucht werden. Insbesondere soll der Einfluss von MITF auf die Sekretion von Chemokinen durch Melanomzelllinien und der damit einhergehende Einfluss auf das Migrationsverhalten der wichtigsten Immunzellpopulationen sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell untersucht werden.

Die Daten dieser Arbeit wurden bereits in der internationalen Fachzeitschrift *Translational Oncology* als Originalarbeit veröffentlicht (s. Kap. 8).

### Fragestellungen:

1. Wie verändert die Überexpression von MITF die Chemokinexpression und Immunzellmigration in den humanen Melanomzelllinien WM8 und WM35 *in vitro*?
2. Wie verändert ein MITF-*knockdown* die Chemokinexpression und Immunzellmigration in den humanen Melanomzelllinien WM8 und WM35 *in vitro*?
3. Wie verändert die Überexpression von MITF die Chemokinexpression und Immunzellmigration in der murinen Melanomzelllinie Yumm1.1 *in vitro*?
4. Wie verändert die Überexpression von MITF die Chemokinexpression und Immunzellmigration in subkutan (s.c.) injizierten Yumm1.1-Tumoren *in vivo*?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Technische Geräte und Reagenzien

Tabelle 1: Technische Geräte

<b>Alpha Imager HP gel imager</b>	Alpha Innotech (Kasendorf, Deutschland)
<b>Cell culture flow HeraSAFE KS</b>	Heraeus, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>CO<sub>2</sub>-Inkubator (BD6220)</b>	Heraeus, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>Fujifilm LAS4000</b>	Fujifilm (Tokyo, Japan)
<b>Neubauer Zählkammer</b>	MTG (Bruckberg, Deutschland)
<b>HERAfreeze™ HFU T Series</b>	Heraeus, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>Hood 2-453-JAND</b>	Köttermann Systemlabor (Hänigsen, Deutschland)
<b>Innova44 Thermoshaker</b>	New Brunswick Scientific, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
<b>Kühl- und Gefrierschränke 4 °C und -20 °C</b>	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland)
<b>Lichtmikroskop Axiovert</b>	Zeiss (Jena, Deutschland)
<b>LightCycler480 System</b>	Roche (Mannheim, Deutschland)
<b>Magnet spinning RH BASIC 2</b>	IKA (Staufen, Deutschland)
<b>Mini Trans-Blot® Cell</b>	BioRad Laboratories (München, Deutschland)
<b>Mithras LB 940</b>	Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
<b>Multifuge 3L-R, X3 and 4KR</b>	Heraeus, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>Nanodrop 2000c</b>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>pH-Meter</b>	WTW (Weilheim, Deutschland)
<b>Pipetus</b>	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
<b>PowerPac™ Universal Power Supply</b>	BioRad Laboratories (München, Deutschland)
<b>Research plus pipet sets</b>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
<b>Rollenmischer CAT RM 5</b>	Zipperer (Deutschland)
<b>SHAKER DOS-10L</b>	NeoLab (Heidelberg, Deutschland)
<b>Sprout minicentrifuge</b>	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
<b>T3 Thermocycler</b>	Biometra (Göttingen, Deutschland)
<b>Thermomixer comfort</b>	Beckman Coulter (Hamburg, Deutschland)
<b>Welch Vakuum Pumpe</b>	Promega (Madison, WI, USA)
<b>Vortex</b>	Jahnke & Kunkel (Staufen, Deutschland)
<b>Zentrifuge 5418r</b>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
<b>Zentrifuge Rotina 420R</b>	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

Tabelle 2: Reagenzien und Chemikalien

<b>Albumin Fraction V (BSA)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Ammonium Chlorid</b>	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<b>BD Pharm Lyse Lysing Buffer (10x)</b>	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
<b>BioColl Separating Solution</b>	BioChrom (Berlin, Deutschland)
<b>Calcium Chlorid</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Collagenase D</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Count Bright® Counting Beads</b>	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Dinatriumphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>DNase 1</b>	Roche (Mannheim, Deutschland)
<b>EcoRI</b>	NEB (Ipswich, MA, USA)
<b>Ethanol 100 %</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Ethylendiamintetraacetat (EDTA)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>FACSFlow, FACSSafe</b>	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
<b>Heparin-Natrium 2.500 IE / 5 ml</b>	Braun AG (Melsungen, Deutschland)
<b>HEPES Puffer 1 M</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Isofluran</b>	CP PHARMA (Burgdorf, Deutschland)
<b>Kaliumchlorid (KCl)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Kaliumhydrogencarbonat (KHCO<sub>3</sub>)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>LB Agar</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>LB Medium</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>LE Agarose</b>	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
<b>Lipofectamine RNAiMAX Reagent</b>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>Milchpulver, blotting grade</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Natrium-Deoxycholate (NaDOC)</b>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>NotI</b>	NEB (Ipswich, MA, USA)
<b>NP-40</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>peqGOLD TriFast</b>	PEQ LABS (Erlangen, Deutschland)
<b>Q5 Enzym</b>	NEB (Ipswich, MA, USA)
<b>Schwefelsäure</b>	Apotheke Innenstadt (LMU München, Deutschland)
<b>SERVA DNA Stain Clear G</b>	SERVA (Heidelberg, Deutschland)
<b>T4-Ligase</b>	NEB (Ipswich, MA, USA)
<b>Teramethylethylendiamin (TEMED)</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>TRIS</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Trypan-Blau</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Tween 20</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Sodium dodecyl sulfate (SDS)</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Tabelle 3: Puffer

<b>Transfektionspuffer</b>	<b>RIPA-Puffer</b>	<b>Laemmli-Puffer</b>	<b>TBS-T</b>	<b>Erylyse Puffer</b>
1,6 g NaCl	50 mM Tris/Cl	300 mM TRIS	50 mM TRIS	167 mM Ammoniumchlorid
74 mg KCl	150 mM NaCl	60 % Glycerol	150 mM NaCl	0,2 mM KHCO <sub>3</sub>
50 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 mM EDTA	12 % SDS	1 % Tween20	2,7 mM EDTA
1 g HEPES	1 % NP-40	0,03 % Bromphenolblau	in Wasser	in Wasser
in 100 ml Wasser	0,25 % Na-DOC	5 % β-Mercaptoethanol		
pH 6,76	0,1 % Protease Inhibitor	in Wasser		
	pH 7,4	pH 6,8		

Tabelle 4: Kommerzielle Kits

<b>Bradford Protein Assay Kit</b>	BioRad (Hercules, California)
<b>Foxp3/Transkriptionsfaktor Färbepufferset</b>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>Gel Purification Kit</b>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>GeneJet Plasmid MiniPrep Kit</b>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>InviTrap Spin Cell RNA Mini Kit</b>	STRATEC Biomedical AG (Birkenfeld, Deutschland)
<b>LightCycler 480 Probes Master</b>	Roche (Mannheim, Deutschland)
<b>Mix2Seq Sequenzierungs-Kit</b>	Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland)
<b>PCR Purification Kit</b>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit</b>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>SuperSignal™ West Pico Chemilumineszenz-Substrat</b>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Tabelle 5: Materialien für die Zellkultur

<b>Blasticidin</b>	Invivogen (San Diego, CA, USA)
<b>Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM)</b>	PAA (Pasching, Österreich)
<b>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</b>	PAA (Pasching, Österreich)
<b>FCS (fetales Kälberserum)</b>	Gibco Products (Brooklyn, NY, USA)
<b>L-Glutamin 200 mM</b>	PAA (Pasching, Österreich)
<b>MEM Non-essential amino acids (NEAA 100x)</b>	Gibco Products (Brooklyn, NY, USA)
<b>OptiMEM</b>	Gibco Products (Brooklyn, NY, USA)
<b>Penicillin / Streptomycin</b>	PAA (Pasching, Österreich)
<b>Puromycin</b>	Invivogen (San Diego, CA, USA)
<b>Roswell Park Memory Institute (RPMI)</b>	PAA (Pasching, Österreich)
<b>Trypsin 10x</b>	PAA (Pasching, Österreich)
<b>Very Low Endotoxin (VLE) RPMI</b>	Biochrom-AG (Berlin, Deutschland)

Tabelle 6: Zellkulturmedien

<b>RPMI Vollmedium</b>	<b>Yumm1.1 Kulturmedium</b>	<b>Plat-E/ Plat-A Kulturmedium</b>	<b>Kryo-Medium</b>
RPMI	DMEM	DMEM	90 % FCS
10 % FCS	10 % FCS	10 % FCS	10 % DMSO
2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin	
100 IU/ml Penicillin	100 IU/ml Penicillin	100 IU/ml Penicillin	
100 µg/ml Streptomycin	100 µg/ml Streptomycin	100 µg/ml Streptomycin	
	1 % NEAA	Puromycin	
		Blasticidin	
			<b>Migrations-Medium</b>
			99 % VLE-RPMI oder OptiMEM
			1 % BSA

## 2.2 Zelllinien

Tabelle 7: Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Zellart</b>	<b>Verwendetes Medium</b>	<b>Herkunft (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von)</b>
<b>WM35</b>	Humane Melanomzelllinie	RPMI Vollmedium	Dr. Bertolotto (Université Côte d'Azur, Frankreich)
<b>WM8</b>	Humane Melanomzelllinie	RPMI Vollmedium	Dr. Bertolotto (Université Côte d'Azur, Frankreich)
<b>Yumm1.1</b>	Murine Melanomzelllinie	Yumm1.1 Kulturmedium	Dr. Bosenberg (Yale University, USA)

## 2.3 FACS-/ Westernblot-Antikörper (Klon)

Tabelle 8: FACS-/ Westernblot-Antikörper (Klon)

<b>Human anti-CD3 (OKT3)</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Human anti-CD4 (OKT4)</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Human anti-CD8 (OKT8)</b>	Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland)
<b>Human anti-CD19 (HIB19)</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Human anti-CD56 (5.1H11)</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Human anti-CD11c (Bu15)</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Human anti-CD14 (63D3)</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Mouse anti-CD3 (17A2)</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Mouse anti-CD4 (GK1.5)</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Mouse anti-FoxP3 (MF-14)</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Mouse anti-CD8 (52-6.7)</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Mouse anti-NK1.1 (PK136)</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Mouse anti-CD11c (N418)</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Mouse anti-CD11b (M1/70)</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Mouse anti-B220 (RA3-6B2)</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Zombie Aqua Fixable Viability Kit</b>	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>β-actin HRP-conjugated Monoclonal Antibody (C4) (1:3000)</b>	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
<b>MitF Monoclonal Antibody (D5) (1:1000)</b>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>IgG-HRP-konjugierter Sekundär-Antikörper (HAF007) (1:2000)</b>	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)

## 2.4 Software

Tabelle 9: Software

<b>Endnote</b>	Thomson Reuters (New York, NY, USA)
<b>FlowJo</b>	Tree Star (Ashland, OR, USA)
<b>GraphPad Prism</b>	GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)
<b>Image Lab</b>	BioRad (Hercules, CA, USA)
<b>Microsoft Office</b>	Microsoft (Redmond, WA, USA)
<b>SnapGene</b>	GSL Biotech LLC (Chicago, IL, USA)

## 2.5 Zelluläre Methoden

### 2.5.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C Temperatur kultiviert und regelmäßig bei 70-80 % Konfluenz passagiert. Alle Experimente mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Air-Flow durchgeführt.

### 2.5.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in Trypanblau verdünnt. Der Farbstoff durchdringt nur nicht-intakte Membranen und färbt so tote Zellen an. Die Anzahl der vitalen Zellen lässt sich mithilfe einer Neubauer-Zählkammer nach folgender Formel bestimmen:

$$\text{Zellen / ml} = \frac{\text{Anzahl Zellen in gezählten Kammern}}{\text{Anzahl gezählter Kammern}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### 2.5.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden Zellen auf  $5 \times 10^6$  / 900 µl in FCS eingestellt und in Cryo-Röhrchen mit 100 µl DMSO gegeben. Diese wurden für 24 h in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter schonend auf -80 °C gebracht und dann dauerhaft im -80 °C-Gefrierschrank oder in Stickstoff gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden diese mit vorgewärmtem Medium in Kulturmedium überführt, durch einen Wasch-Schritt wurde das Kryo-Medium entfernt. Die Zellen wurden in frischem Kulturmedium aufgenommen und in geeignete Zellkulturflaschen überführt.

### 2.5.4 Kultivierung von Tumorzellen

Die verwendeten Tumorzellen wurden in Kollagen-beschichteten Zellkulturflaschen kultiviert und in regelmäßigen Abständen unter dem Lichtmikroskop auf Zeichen von Zelltod oder mikrobiellem Befall untersucht. Je nach Wachstumsverhalten wurden sie zwei bis drei Mal pro Woche passagiert. Da es sich bei allen in diesem Projekt verwendeten Tumorzellen um adhärenz Zellen handelt, wurden diese zum Ablösen mit Trypsin behandelt. Nach einem Wasch-Schritt wurde ein Teil der Zellen wieder mit frischem Medium in die Zellkulturflasche gegeben. Eine Infektion wurde durch regelmäßige Testung ausgeschlossen.

### 2.5.5 Gewinnung von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Venöses Blut von gesunden Spendern wurde steril in heparinisierte Spritzen abgenommen, dieses wurde 1:1 mit sterilem NaCl gemischt. Diese Lösung wurde vorsichtig auf Biocoll Separation Solution geschichtet. Nach einer Zentrifugation über 30 Minuten bei 1000 x g, 20 °C und kleinstmöglicher Bremse konnte man die Schicht der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) entnehmen. Nach mehrmaligem Waschen konnten die Zellen entweder kultiviert oder direkt für Experimente genutzt werden.

### 2.5.6 siRNA-Transfektion von Tumorzellen

Mittels MITF-spezifischer siRNA sollte ein temporärer *knockdown* des Zielgens in den Tumorzellen hervorgerufen werden. siRNAs wurden bei metabion international AG (Planegg, Deutschland)

bestellt und nach Herstellerangaben gelagert und verwendet. Die Sequenzen der verwendeten siRNAs wurden bereits an anderer Stelle publiziert (Wiedemann *et al.*, 2019).

#### 2.5.7 Transfektion von Platinum-E-/ Platinum-A-Zellen

Für die Transfektion dieser Verpackungszelllinien wurden 18 µg der Plasmid-DNA mit 15 µl steril filtriertem 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> versetzt und mit autoklaviertem Wasser auf 150 µl gebracht. Diese Plasmid-Lösung wurde tröpfchenweise auf 150 µl Transfektionspuffer gegeben, während die Flüssigkeiten mithilfe eines Vortexers gut durchmischt wurden. Die Lösung wurde durch einen 20 µm-Filter steril filtriert. Das Puffer-Plasmid-Gemisch wurde gleichmäßig auf die am Vortag ausplattierten Zellen gegeben und für sechs Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und für weitere 42 h bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit wird nun von den Verpackungszelllinien Virus produziert, welches das Plasmid mit der gewünschten genetischen Modifikation in sein Genom einbaut. Diese Virusüberstände können nach der Inkubationszeit von den Zellen abgenommen und für die Transduktion genutzt werden.

#### 2.5.8 Transduktion von Tumorzellen

In diesem Projekt wurden Tumorzellen retroviral transduziert, dabei infizieren Retroviren ihre Zielzellen und integrieren einen Teil ihres Genoms in das der Wirtszelle. Die Virusproduktion fand in den Verpackungszelllinien Platinum-A für humane oder murine Zelllinien statt, in Platinum-E ausschließlich für murine Zelllinien. Zunächst wurde mittels oben beschriebener Methode Virus generiert. Dieser wurde durch einen 45 µm Filter filtriert um Zellen und Zelldebris zu entfernen. Das Kulturmedium der am Vortag plattierten Tumorzellen wurde abgenommen und durch 1 ml Virusüberstand pro Well ersetzt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurden 2 bis 3 ml Kulturmedium hinzugegeben. Nach ca. 24 h wurde die Transduktionseffizienz überprüft.

#### 2.5.9 Migrations-Assay

In einem Migrations-Assays wird jedes Well durch ein Insert in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilt. In diesem Projekt wurden *Transwell Migration Plates* von Corning (Kalifornien, USA) verwendet, in welcher eine 0,3 µm-porige Membran die Kompartimente trennt. Ins obere Well wurden humane oder murine Immunzellen gegeben, im unteren Well befanden sich konditionierte Tumorzellüberstände. Der genaue Versuchsaufbau wurde bereits an anderer Stelle publiziert (Wiedemann *et al.*, 2019).

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden mithilfe eines DNA-*templates* und ausgewählten Primern ein bestimmter Abschnitt einer Nukleinsäure amplifiziert. Das allgemeine Prinzip einer PCR besteht aus drei Abschnitten: Denaturierung, Primer-Bindung (*Annealing*) und Elongation. Diese drei Schritte werden 30 bis 40 Mal wiederholt und liefern so in wenigen Stunden große Mengen des gewünschten DNA-Abschnitts. Resultate wurden entweder direkt in weiteren Experimenten verwendet oder bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt. Durch das Anlegen eines elektrischen Spannungsfelds wandert die negativ geladene DNA zur Kathode, wobei kleine Fragmente weiter gelangen als große, welche durch die Struktur des Gels zurückgehalten werden. Höherprozentige Gele (2 % w/v) eignen sich zur Auftrennung kleinerer DNA-Moleküle, Gele mit geringerer Agarosekonzentration wurden beispielsweise zur Auftrennung von Plasmid-DNA mit mehr als 5000 Basenpaaren genutzt.

### 2.6.3 Klonierung von PCR-Produkten

In diesem Projekt wurde ein Konstrukt kloniert, welches das Zielgen (MITF-M) gekoppelt an einen Farbstoff (grün-fluoreszierendes Protein, GFP) in einem viralen Vektor enthält.

#### 2.6.3.1 Vektoren

Genutzt wurde der virale pMP71-Vektor (freundlicherweise unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt von C. Baum, Hannover) mit einer Ampicillin-Resistenz zur Selektion.

#### 2.6.3.2 Overlap-Extension-PCR und Primer-Design

Zur Fusion zweier Gensequenzen wurde die Overlap-Extension-PCR verwendet (Heckman *et al.*, 2007). Die dafür benötigten Primer wurden bei metabion international AG bestellt nach folgenden Richtlinien mit Snapgene® designt: Die Primer sollten eine Länge von ca. 15-30 Nukleotiden haben, der Anteil der Basen Guanin und Cytosin sollte 30-50 % betragen, die Schmelz-Temperaturen zweier Primer sollten sich nicht um mehr als 5 °C unterscheiden. Innerhalb der Primersequenz und des DNA-*templates* sollen keine Abschnitte zueinander komplementär sein.

Tabelle 10: Sequenzen der Klonierungsprimer

<b>MITF (Not1+Kozak) forward</b>	5'-ATT AGC GGC CGC GCC ACC ATG CTG GAA ATG CTA GAA TAT AAT CAC TAT CAG G-3'
<b>MITF-2A revers</b>	5'-AAT TCA AAG TCT GTT TCA CGG TGG CGA CCG GTG GAT-3'



---

<b>MITF-2A forward</b>	5'-GTC GCC ACC GTG AAA CAG ACT TTG AAT TTT GAC CTT C-3'
<b>GFP-EcoRI revers</b>	5'-TAA TGA ATT CTT ACT TGT ACA GCT C-3'

---

#### 2.6.3.3 Restriktion

Um das entstandene Fragment (*Insert*) in einen Vektor zu einfügen, müssen passende Restriktionsschnittstellen vorhanden sein. Diese können entweder bereits im *template* vorhanden sein, oder durch die flankierenden Primer eingefügt werden. In diesem Projekt wurden Schnittstellen der Restriktionsenzyme Not1 und EcoR1 genutzt. Der Reaktionsansatz erfolgte bei 37 °C über Nacht: 0,5 µl Not1 *high fidelity*, 0,5 µl EcoR1 *high fidelity*, 5 µl CutSmart Buffer, 1 µg DNA *template*, auffüllen mit H<sub>2</sub>O bis 50 µl. Nach erfolgter Restriktion mussten die Produkte aufgereinigt werden, dies erfolgte für das *Insert* mit dem PCR Purification Kit. Der Vektor wurde in ein angemessenes Agarosegel aufgetragen und mit dem Gel Purification Kit aufgereinigt.

#### 2.6.3.4 Ligation

In einem nächsten Schritt erfolgte die Ligation des geschnittenen Vektors mit dem Insert mittels der T4-Ligase (NEB), da nun beide Anteile freie komplementäre *sticky ends* besitzen. Mit dem NEBio Ligation Calculator wurde anhand der Basenpaare ein optimales Insert-zu-Vektor-Verhältnis (in der Regel 3:1) errechnet. Die Reaktion fand bei 16 °C über 16 h statt.

#### 2.6.3.5 Transformation

Die Transformation erfolgte nach dem Hitzeschock-Prinzip mit kompetenten Bakterien von NEB. Die Bakterien wurden aus -80 °C auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock von 42 °C für 90 Sekunden, danach wurden die Bakterien mit dem neuen Plasmid für weitere 10 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nun wurde eine Vorkultur mit Antibiotika-freiem Medium bei 37 °C für eine Stunde angesetzt. Anschließend wurden sie auf einer Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Einzelkolonien gepickt und mit dem Miniprep-Kit aufgereinigt. Durch eine Kontroll-Restriktion wurde getestet, ob das gewünschte Konstrukt in den Vektor eingebaut wurde. Mit dem eurofins-Sequenzierungs-Kit wurde die genaue Basensequenz geprüft. Ergebnisse ohne Mutationen oder solche mit lediglich *Sense*-Mutationen wurden für weitere Experimente verwendet.

#### 2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der SDS-PAGE werden Proteine ihrer Größe nach in einem elektrischen Spannungsfeld aufgetrennt. In diesem Projekt wurden 10 %-Gele verwendet. Zur Proteingewinnung wurden gleichmäßig ausplattierte Zellen mittels RIPA-Puffer lysiert. Die Proteine wurden in Laemmli-Puffer gegeben und in die Taschen des Gels aufgetragen. Die Elektrophorese fand für 30 Minuten bei

100 V und eine Stunde bei 150 V statt. Danach wurden die Proteine im Gel auf eine 4,5 µm PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde für 30 Sekunden in Methanol aktiviert, danach in TBS-T gewaschen und auf dem Gel positioniert. Das Blotting erfolgte in der Mini TransBlot® Cell. Spezifische Proteine können mithilfe der *Western Blot*-Methode (siehe unten) dargestellt werden.

#### 2.6.5 Extraktion zytoplasmatischer Ribonukleinsäure

Die Isolation von zytoplasmatischer Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) erfolgte mit dem InviTrap Spin Cell RNA Mini Kit nach Herstellerangaben mithilfe einer Tischzentrifuge. Die RNA wurde entweder sofort in weiteren Versuchen verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

#### 2.6.6 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA in DNA transkribiert, unter experimentellen Bedingungen spricht man von *copyDNA* (cDNA). Mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit wurde isolierte RNA gemäß Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Mit dem NanoDrop wurde die cDNA-Konzentration gemessen und die Qualität bewertet. cDNA wurde entweder bei 4 °C gelagert oder direkt für weitere Versuche verwendet.

#### 2.6.7 Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative realtime PCR*, q-RT-PCR), funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie die konventionelle PCR, ermöglicht allerdings eine Quantifizierung des entstandenen Produkts. Hierzu wurde der LightCycler 480 von Roche verwendet, welcher mit Fluoreszenzmessung arbeitet. Eine relative Quantifizierung des Zielgens kann durch Ermittlung eines Referenzgens erfolgen, welches durch die Versuchsbedingungen nicht beeinflusst werden sollte. In dieser Arbeit wurden Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) oder Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgene verwendet. Die Primer-Sequenzen wurden dem Roche Assay Design Center entnommen und bei metabion international AG bestellt. Die verwendeten Primer wurden bereits an anderer Stelle publiziert (Wiedemann *et al.*, 2019). Die passenden Fluoreszenz-Sonden wurden dem Universal Probe Library Set entnommen.

### 2.7 Immunologische Methoden

#### 2.7.1 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) kann man Zellen mittels fluoreszierender Antikörper gezielt charakterisieren. Einzelne Zellen passieren einen Laserstrahl, welcher durch das Eintreffen der Zellen gebrochen wird, wodurch die Größe und Granularität einer Zelle bestimmt werden können. Durch den Laser werden die Farbstoffe der gebundenen Antikörper aktiviert, diese emittieren Licht in einer bestimmten Wellenlänge. Da jeder

Farbstoff ein unterschiedliches Absorptions- und Emissionsmaximum hat, können gleichzeitig verschiedene Farben gemessen werden. Für dieses Projekt wurde das BD LSRFortessa<sup>TM</sup> genutzt. Die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper wurden nach Herstellerangaben mit den Zellen inkubiert. Für intrazelluläre Färbungen wurden die Zellen mithilfe des Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3)/ Transcription Factor Staining Buffer Kit permeabilisiert und nach dem Oberflächen-Staining die intrazellulären Marker gefärbt. Die Daten wurden mit der FlowJo Software ausgewertet.

#### 2.7.2 Western Blot

Nach erfolgreichem Übertragen der Proteine aus Zelllysaten auf die Membran können spezifische Proteine mithilfe von Antikörpern angefärbt werden. Der genaue Versuchsaufbau wurde bereits an anderer Stelle publiziert (Wiedemann *et al.*, 2019). Zur Auswertung und Densitometrie der WesternBlots wurde die ImageLab Software (BioRad, Kalifornien, USA) verwendet.

### 2.8 Tierversuche

Alle Tierversuche dieser Arbeit wurden von der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern, München, Deutschland) genehmigt und unter a priori in einem speziellen Tierversuchsantrag festgelegten Richtlinien durchgeführt.

#### 2.8.1 Mäuse

Weibliche C57Bl/6-Mäuse wurden im Alter von 4 Wochen von Charles River erworben. Ab einem Aufenthalt von einer Woche in der Tierhaltung wurden die Mäuse in die Versuche aufgenommen und waren zu Versuchsstart fünf bis zwölf Wochen alt.

#### 2.8.2 Isolation von Splenozyten

Für die Gewinnung von Splenozyten wurden C57Bl/6 Mäuse mit Isofluran narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Die Milz wurde entnommen und unter sterilen Bedingungen mehrfach durch Injektion mit PBS ausgespült. Die so herausgelösten Zellen wurden aufgefangen und durch einen 30 µm-porigen Zellsieb gefiltert. Erythrozyten wurden durch Zugabe von Erylyse-Puffer zerstört. Die übrigen Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und für die *in vitro*-Migrationsversuche mit Tumorzellüberständen von Yumm1.1 verwendet.

#### 2.8.3 *In vivo*-Tumorversuche

Für die *in vivo*-Tumorversuche wurden  $2 \times 10^6$  Yumm1.1 in 100 µl PBS resuspendiert und subkutan in die Flanken der Mäuse injiziert. Das Tumorwachstum wurde alle zwei bis drei Tage verblindet gemessen. Sobald eine Maus ein vorbestimmtes Abbruchkriterium erreichte, wurden alle Mäuse eines Versuchsansatzes getötet und die Tumoren entnommen. Diese wurden in 1 mg/ml

Kollagenase and 0,05 mg/mL DNase inkubiert und zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Diese wurde durch ein 100 µm und ein 30 µm Zellsieb gefiltert, durch Zugabe von Erylyse-Puffer wurden Erythrozyten aus dem Tumorlysat entfernt. Die verbliebenen Zellen wurden mehrfach mit PBS gewaschen. Teile der Einzelzellsuspension wurden für die durchflusszytometrische Analyse der Immunzellinfiltration und zur RNA-Isolation zur Chemokinbestimmung aufbereitet. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem peqGOLD-Trizol-Kit, Qualität und Quantität wurden mit dem NanoDrop bestimmt.

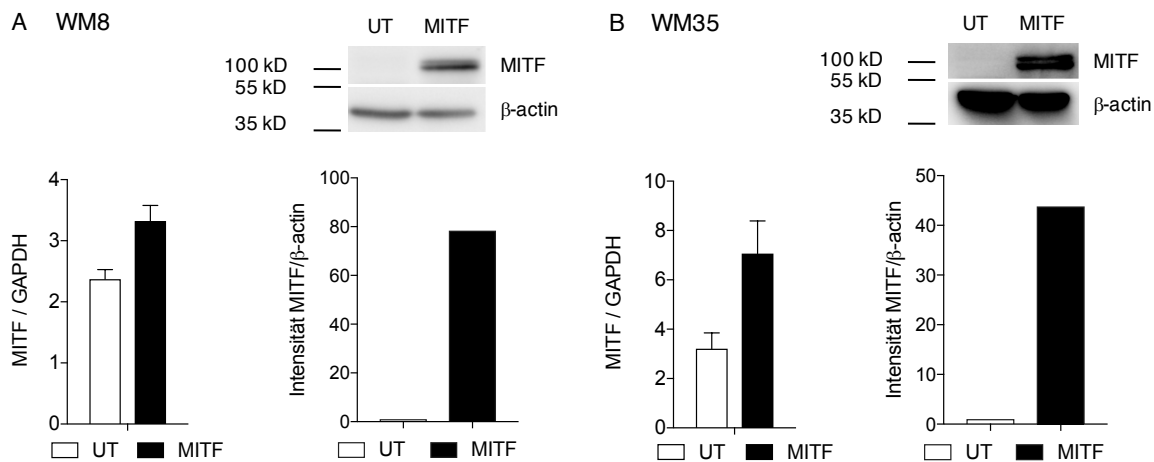
## 2.9 Statistik

Statistische Analysen wurden mit der GraphPad Prism Software durchgeführt und wurde mit dem Student's t Test für unabhängige Stichproben berechnet, für das Tumorwachstum mit two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei  $p < 0,05$ , Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of mean*, SEM).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 MITF-Überexpression in den humanen Melanomzelllinien WM8 und WM35

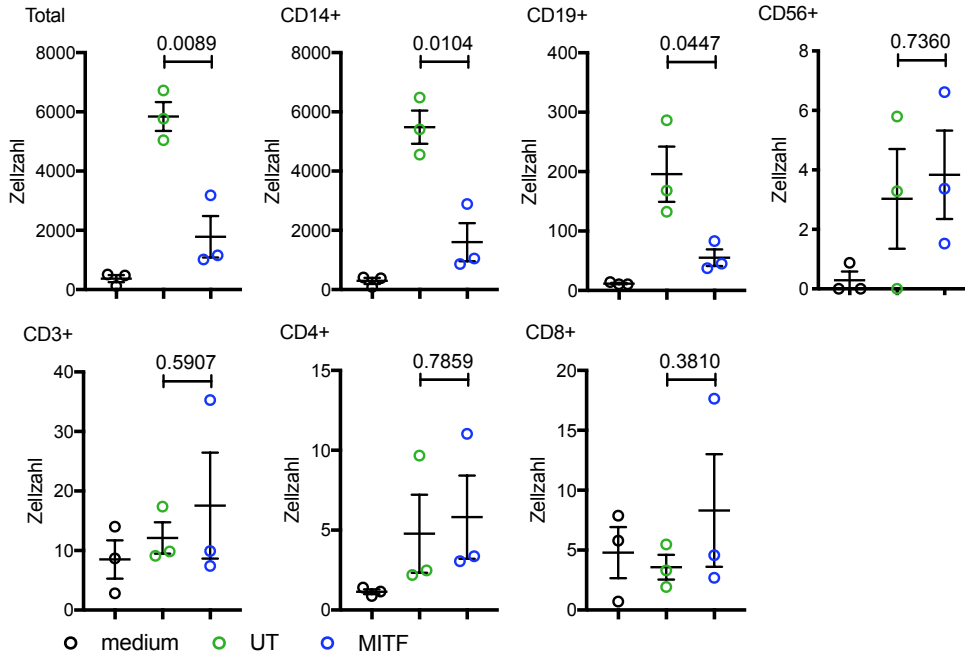
Zunächst sollte der Einfluss von MITF im humanen Melanommodell untersucht werden. Es wurden zwei Zelllinien mit einer intermediären Expression von MITF gewählt, um sowohl einen *knockdown* als auch eine Überexpression von MITF in derselben Zelllinie durchführen zu können. Die Zelllinie WM35 verfügt über eine aktivierende BRAF-Mutation, die Zelllinie WM8 hingegen besitzt Wildtyp-BRAF (Smalley *et al.*, 2008). Für die Überexpression wurde mittels eines retroviralen Vektors die humane, melanozytenspezifische Transkriptionsvariante MITF-M (gekoppelt an GFP) in die beiden Zelllinien WM8 und WM35 eingeschleust, als Kontrolle dienten untransduzierte WM8 bzw. WM35. Die Überexpression von MITF wurde mittels qPCR und WesternBlot bestätigt (Abbildung 4A, B).



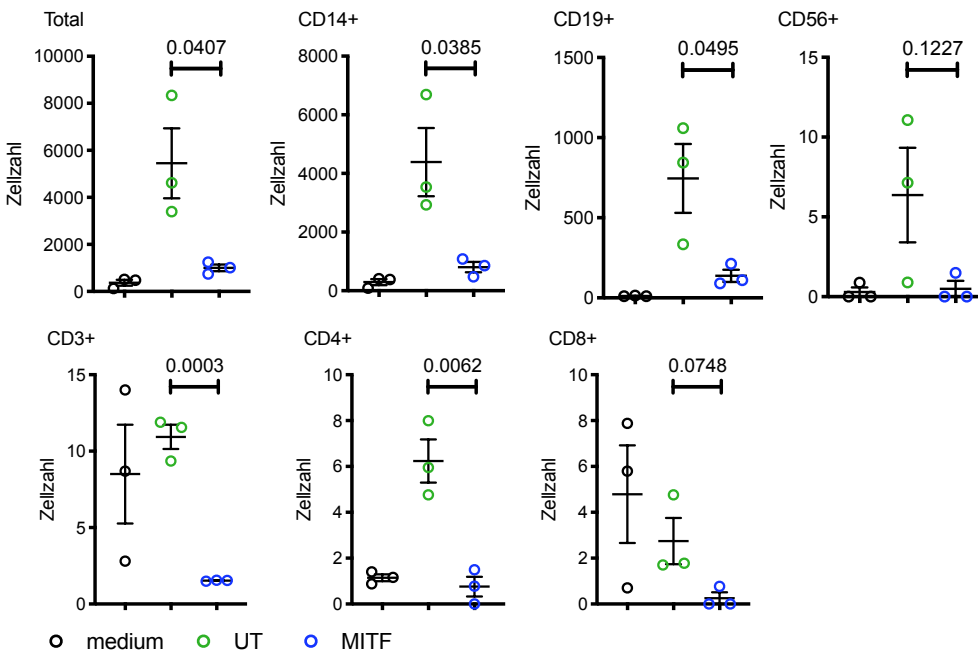
**Abbildung 4: MITF-Überexpression in den humanen Melanomzelllinien WM8 (A) und WM35 (B).** Linkes Panel: MITF-mRNA-Expression mittels q-RT-PCR in MITF-überexprimierenden (MITF) oder untransduzierten (UT) Melanomzelllinien. GAPDH diene als Referenzgen. Daten zeigen Mittelwert aus drei technischen Replikaten und SEM. Rechtes Panel: MITF-Protein-Expression mittels WesternBlot und densitometrische Darstellung.  $\beta$ -actin diene als Referenzgen. Daten zeigen ein technisches Replikat. Die Effizienz der MITF-Überexpression wurde für jedes unabhängige Experiment verifiziert.

#### 3.2 MITF-Überexpression in WM8 und WM35 führt zu verringerter Migration von CD14<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Zellen *in vitro*

Es sollte untersucht werden, ob sich die Migration von Immunzellen durch die Überexpression von MITF in den Tumorzellen verändert. Hierfür wurden PBMC aus dem Blut von gesunden Spendern isoliert und deren *in vitro*-Migrationsverhalten zu den Überständen der Tumorzellen untersucht. Für beide Melanomzelllinien konnte eine verringerte Migration der CD14<sup>+</sup> Monozyten und CD19<sup>+</sup> B-Zellen hin zu den Überständen der MITF-überexprimierenden Zellen beobachtet werden. Für T-Lymphozytenpopulationen und NK-Zellen zeigte sich in WM8 (Abbildung 5) keine veränderte Migration. In WM35 (Abbildung 6) bestand im gezeigten Versuch zwar ein statistisch signifikanter Unterschied in der Migration von CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen, aufgrund der geringen Anzahl an gemessenen Events wurde hier jedoch nicht von einem tatsächlichen Effekt ausgegangen.



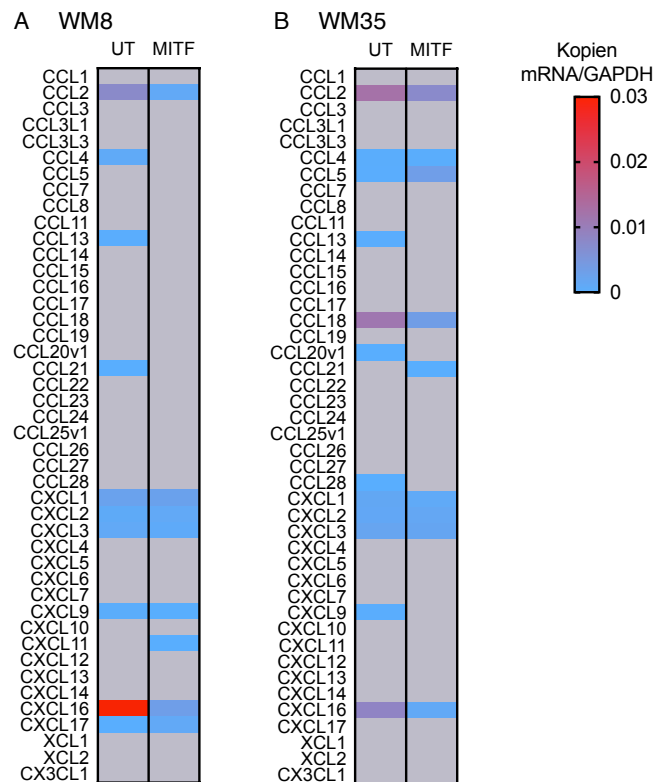
**Abbildung 5: MITF-Überexpression in WM8 führt zu verringerter Migration von CD14<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Zellen *in vitro*.** FACS-basierte Auswertung von Transwell-Migration-Assays verschiedener Immunzell-populationen aus PBMC zu Tumorzellüberständen von untransduzierten (UT) und MITF-transduzierten (MITF) WM8, sowie zur Mediumkontrolle. Ein Datenpunkt zeigt migrierte Zellen pro Well. Daten zeigen Mittelwert und SEM und sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei  $p < 0,05$ .



**Abbildung 6: MITF-Überexpression in WM35 führt zu verringerter Migration von CD14<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Zellen *in vitro*.** FACS-basierte Auswertung von Transwell-Migration-Assays verschiedener Immunzell-populationen aus PBMC zu Tumorzellüberständen von untransduzierten (UT) und MITF-transduzierten (MITF) WM35, sowie zur Mediumkontrolle. Ein Datenpunkt zeigt migrierte Zellen pro Well. Daten zeigen Mittelwert und SEM und sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei  $p < 0,05$ .

### 3.3 MITF-Überexpression in WM8 und WM35 verändert ihre Chemokinexpression

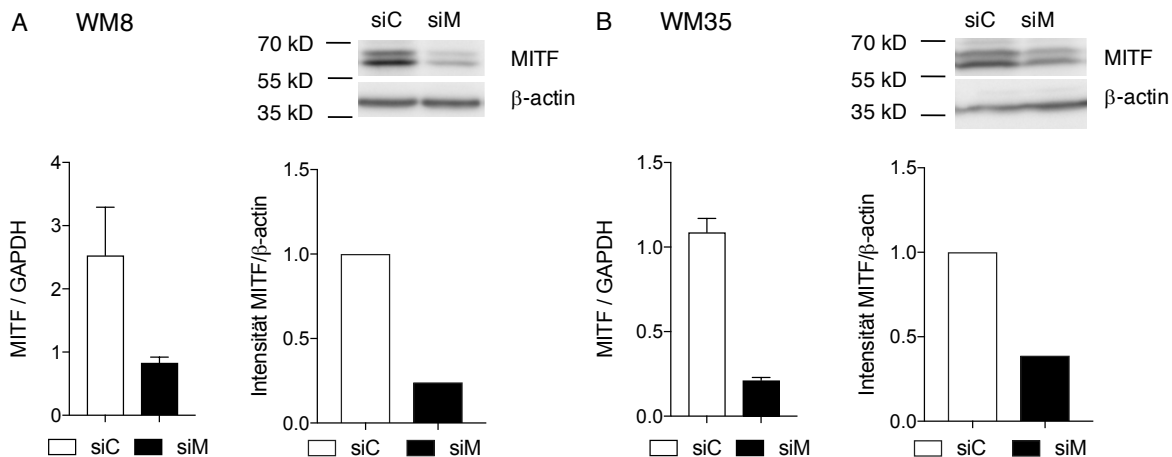
Hauptverantwortlich für die Rekrutierung von Immunzellen an ihren Effektorort sind Chemokine. Daher wurden nun alle bekannten CC-, CXC-, CX3C- und XC-Motiv-Chemokine auf mRNA-Ebene in MITF-transduzierten und untransduzierten WM8 (Abbildung 7A) und WM35 (Abbildung 7B) bestimmt, um zu prüfen, ob sich die Chemokinexpression der Tumorzellen durch die MITF-Überexpression verändert und eine Erklärung für die verminderte Migration von Monozyten und B-Zellen liefern könnte. Insgesamt waren die meisten Chemokine in den humanen Zelllinien auf mRNA-Ebene nicht detektierbar oder nur in grenzwertig geringen Mengen messbar. Es waren in beiden Zelllinien keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachweisbar, für einige Chemokine war jedoch ein Trend zur verminderten Chemokinexpression in MITF-überexprimierenden Tumorzellen erkennbar. Demnach war in beiden Zelllinien CCL2 vermindert nachweisbar (Abbildung 7A, B), ebenso CXCL16, in WM35 auch CCL18. Insgesamt konnte die Analyse der Chemokinexpression die beobachteten Unterschiede in der *in vitro*-Migration in diesem Experiment jedoch nur unzureichend erklären.



**Abbildung 7: MITF-Überexpression in WM8 und WM35 verändert ihre Chemokinexpression.** Heatmap der Chemokin-mRNA-Expression in WM8 (A) oder WM35 (B) mittels q-RT-PCR nach MITF-Überexpression (MITF) oder in untransduzierten Zellen (UT). GAPDH diente als Referenzgen. Graue Felder zeigen Chemokine unterhalb der Nachweisgrenze. Daten sind gepoolt aus drei unabhängigen Experimenten mit je drei technischen Replikaten.

### 3.4 MITF-*knockdown* in den humanen Melanomzelllinien WM8 und WM35

Basierend auf den Ergebnissen der Überexpression von MITF sollte nun untersucht werden, ob eine Depletion des endogen exprimierten Transkriptionsfaktors Auswirkungen auf die Immunzellmigration und die Chemokinexpression der Tumorzellen hat. Mittels siRNA wurde ein transients *knockdown* von MITF (siM) in WM8 (Abbildung 8A) und WM35 (Abbildung 8B) durchgeführt. Als Kontrolle diente eine siRNA, deren Zielsequenz die Luciferase GL2 ist (siC), welche in diesen Zellen nicht exprimiert wird.

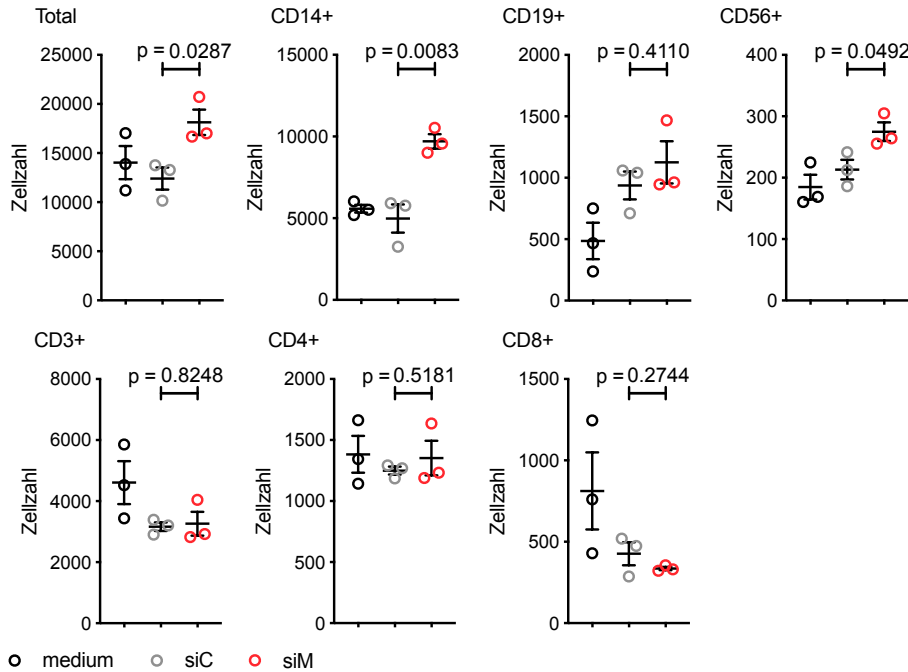


**Abbildung 8: Effizienz des MITF-*knockdown* in den humanen Melanomzelllinien WM8 (A) und WM35 (B).** siRNA-vermittelter *knockdown* von MITF (siM) oder einer Kontroll-Sequenz (siC). Linkes Panel: MITF-mRNA-Expression mittels q-RT-PCR. GAPDH diente als Referenzgen. Daten zeigen Mittelwert aus drei technischen Replikaten und SEM. Rechtes Panel: MITF-Protein-Expression mittels WesternBlot und densitometrische Darstellung.  $\beta$ -actin diente als Referenzgen. Daten zeigen ein technisches Replikat. Die Effizienz des MITF-*knockdowns* wurde für jedes unabhängige Experiment verifiziert.

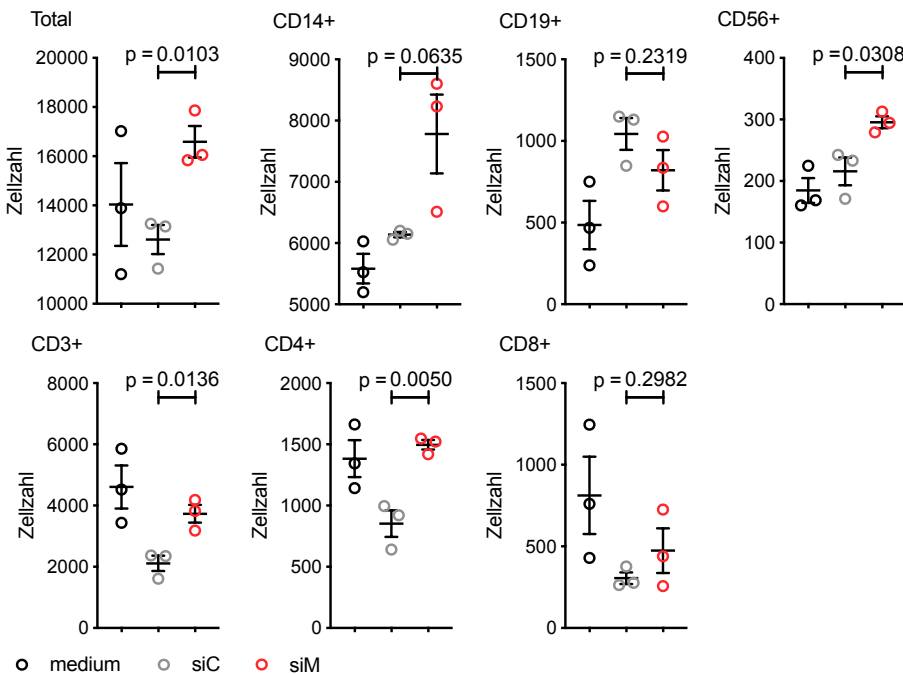
### 3.5 MITF-*knockdown* in WM8 und WM35 führt zu gesteigerter Immunzell-Migration *in vitro*

Passend zur Beobachtung, dass die Immunzellmigration durch MITF-Überexpression vermindert wurde, fand sich nun eine verstärkte Migration von Immunzellen zu den Überständen der Tumorzellen nach MITF-*knockdown*. Ein konsistentes Ergebnis fand sich für die CD14<sup>+</sup> Zellen in der Zelllinie WM8 (Abbildung 9), welche nach MITF-*knockdown* eine verstärkte Migration zu den Tumorüberständen zeigten, während diese nach MITF-Überexpression vermindert war (Abbildung 5). Ebenso konnte dies in der Zelllinie WM35 (Abbildung 10) beobachtet werden, jedoch wurde nur in einem von drei Experimenten eine statistische Signifikanz erreicht. In der Zelllinie WM35 migrierten außerdem in zwei der drei Wiederholungen die CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt (Abbildung 10).





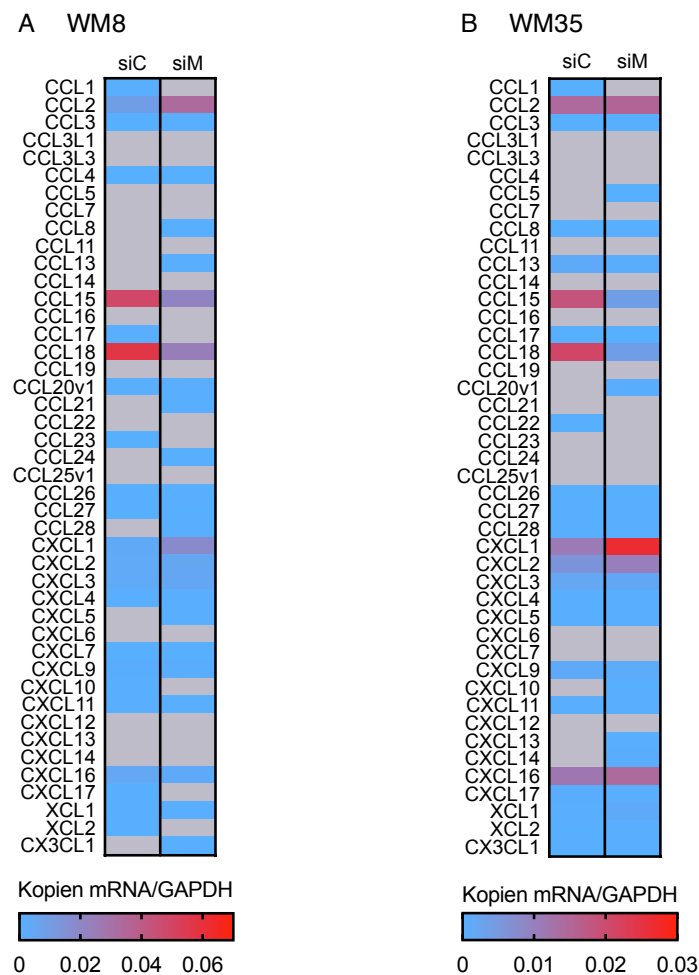
**Abbildung 9: MITF-knockdown in WM8 führt zu gesteigerter Migration CD14<sup>+</sup> Zellen *in vitro*.** FACS-basierte Auswertung von Transwell-Migration-Assays verschiedener Immunzellpopulationen von PBMC zu Tumorzellüberständen von MITF-depletierten (siM) oder kontrollbehandelten (siC) WM8, sowie zur Mediumkontrolle. Daten zeigen migrierte Zellen pro Well. Fehlerbalken zeigen Mittelwert und SEM. Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei  $p < 0,05$ .



**Abbildung 10: MITF-knockdown in WM35 führt zu gesteigerter Migration CD14<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen *in vitro*.** FACS-basierte Auswertung von Transwell-Migration-Assays verschiedener Immunzellpopulationen von PBMC zu Tumorzellüberständen von MITF-depletierten (siM) oder kontrollbehandelten (siC) WM35, sowie zur Mediumkontrolle. Daten zeigen migrierte Zellen pro Well. Fehlerbalken zeigen Mittelwert und SEM. Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei  $p < 0,05$ .

### 3.6 MITF-*knockdown* in WM8 und WM35 verändert ihre Chemokinexpression

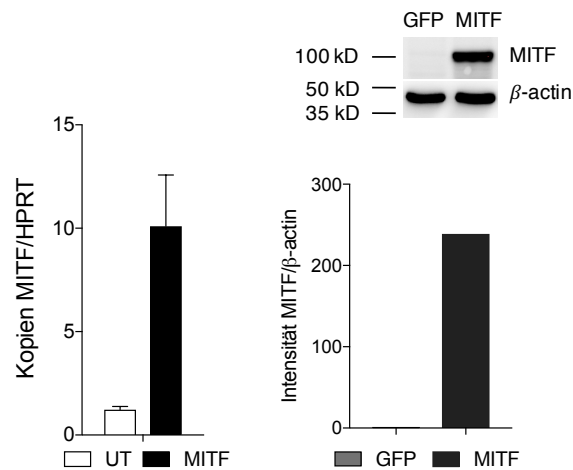
Auch von den MITF-depletierten Tumorzellen sollte ein Chemokinprofil dazu beitragen, die veränderte Migration besser zu verstehen. Ebenso wie in den Überexpressionsversuchen waren auch hier in beiden Zelllinien nur geringe Level der Chemokine messbar. Höhere Mengen und signifikante Unterschiede fanden sich sowohl in den WM8 (Abbildung 11A) als auch in WM35 (Abbildung 11B) nur in der Expression von CCL15 und CCL18, interessanterweise wurden diese nach MITF-*knockdown* vermindert exprimiert. Alle anderen Chemokine zeigten keine Unterschiede in den Expressionsmustern, allerdings konnte in der Zelllinie WM35 eine geringfügig verstärkte Expression von CXCL1 und CXCL2 in den MITF-depletierten Zellen beobachtet werden (Abbildung 11B), in der Zelllinie WM8 traf dies für CCL2 und CXCL1 zu (Abbildung 11A).



**Abbildung 11: MITF-*knockdown* führt zu veränderter Chemokinexpression in WM8 (A) und WM35 (B).** Heatmap der Chemokin-mRNA-Expression mittels q-RT-PCR nach MITF-*knockdown* (siM) oder in kontrollbehandelten Zellen (siC). GAPDH diente als Referenzgen. Graue Felder zeigen Chemokine unterhalb der Nachweisgrenze. Daten sind gepoolt aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten.

### 3.7 MITF-Überexpression in der murinen Melanomzelllinie Yumm1.1

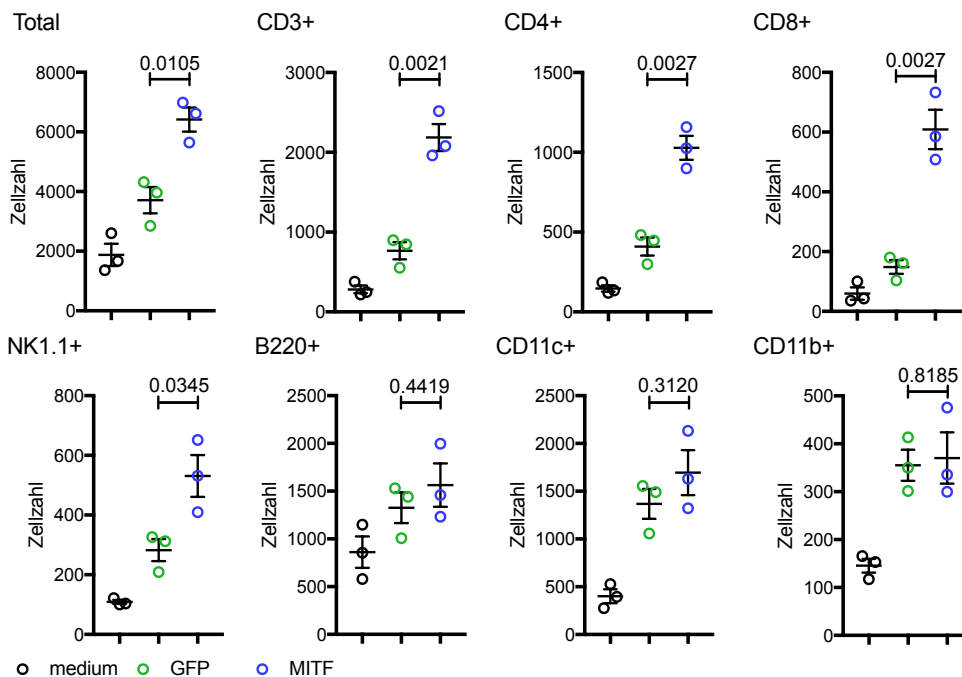
Als nächstes sollte der Effekt von MITF auf Immunzellmigration und Chemokinexpression auch im murinen Modell untersucht werden, insbesondere um Versuche auch in einem immunkompetenten Organismus durchführen zu können. Die Zelllinie Yumm1.1 verfügt über eine aktivierende BRAF-Mutation, wie sie in der Mehrzahl der humanen Melanome nachgewiesen werden kann (Davies 2002, Meeth 2016). Die Zelllinie Yumm1.1 exprimiert nur sehr niedrige Level an MITF, weshalb sie als Modell besonders geeignet ist, die Effekte einer Überexpression von MITF zu analysieren. Für die Überexpression wurde das gleiche Konstrukt wie im humanen Modell verwendet, mittels eines retroviralen Vektors wurden die Zellen mit der humanen melanozytenspezifischen Transkriptionsvariante MITF-M (gekoppelt an GFP) transduziert, als Kontrolle dienten Wildtyp- oder GFP-transduzierte Yumm1.1-Zellen. Die Überexpression von MITF wurde mittels q-RT-PCR und WesternBlot (Abbildung 12) bestätigt.



**Abbildung 12: MITF-Überexpression in murinen Yumm1.1.** Linkes Panel: MITF-mRNA-Expression mittels q-RT-PCR in MITF-überexprimierenden (MITF) oder untransduzierten (UT) Yumm1.1. HPRT diene als Referenzgen. Daten zeigen Mittelwert aus drei technischen Replikaten und SEM. Rechtes Panel: MITF-Protein-Expression in GFP-transduzierten (GFP) und MITF-überexprimierenden (MITF) Yumm1.1 mittels WesternBlot und densitometrische Darstellung. β-actin diene als Referenzgen. Daten zeigen ein technisches Replikat. Die Effizienz der MITF-Überexpression wurde für jedes unabhängige Experiment verifiziert.

### 3.8 MITF-Überexpression in Yumm1.1 führt zu gesteigerter Immunzellmigration *in vitro*

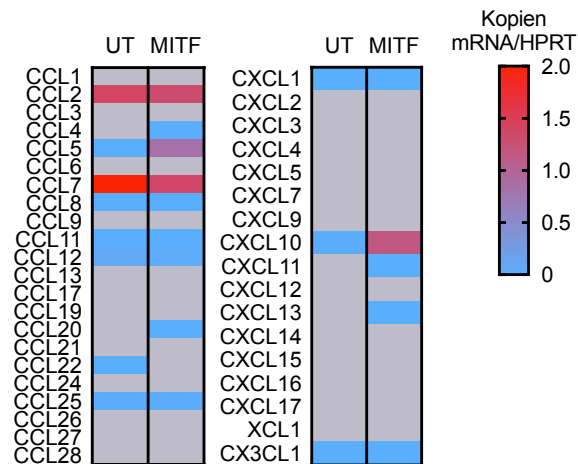
Als erstes sollte auch hier der Einfluss auf die Immunzellmigration *in vitro* untersucht werden. Hierzu wurden Splenozyten aus syngeneten C57Bl/6 Mäusen gewonnen und deren Migration zu Kulturmedien der Yumm1.1-Melanomzellen untersucht. Es fand sich eine gesteigerte Migration der  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Lymphozyten und der NK-Zellen hin zu den Überständen der MITF-überexprimierenden Zellen (Abbildung 13). Die Migration der dendritischen ( $CD11c^+$ ) und myeloiden ( $CD11b^+$ ) Zellen sowie der B-Zellen ( $B220^+$ ) unterschied sich zwischen den einzelnen Konditionen nicht (Abbildung 13).



**Abbildung 13: MITF-Überexpression in Yumm1.1 führt zu gesteigerter Immunzellmigration *in vitro*.** FACS-basierte Auswertung von Transwell-Migration-Assays verschiedener Immunzellpopulationen aus murinen Splenozyten (C57Bl/6) zu Überständen von GFP-transduzierten (GFP) oder MITF-transduzierten (MITF) Yumm1.1 sowie zur Medium-Kontrolle. Ein Punkt zeigt Mittelwert aus drei technischen Replikaten. Daten zeigen Mittelwert und SEM aus migrierten Splenozyten einer Maus zu drei unabhängig gewonnenen Tumorzellüberständen und sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei  $p < 0,05$ .

### 3.9 MITF-Überexpression in Yumm1.1 steigert ihre CCL5- und CXCL10-Expression *in vitro*

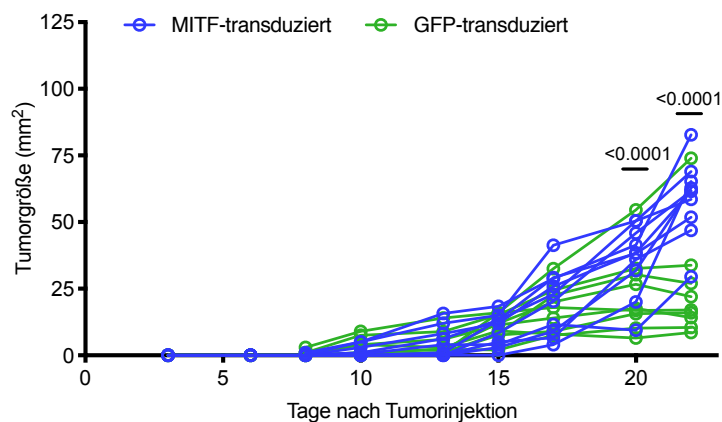
Analog zu den Versuchen im humanen Modell wurden nun alle bekannten murinen CC-, CXC-, CX3C- und XC-Motiv-Chemokine auf mRNA Level in MITF- und untransduzierten Yumm1.1-Zellen bestimmt, um eine Erklärung für das Migrationsverhalten zu finden. Es fanden sich signifikant erhöhte Level von CCL5 und CXCL10 in den MITF-überexprimierenden Zellen (Abbildung 14).



**Abbildung 14: MITF-Überexpression in Yumm1.1 steigert ihre Expression von CCL5 und CXCL10 *in vitro*.** Heat-Map der Chemokin-mRNA-Expression untransduzierter (UT) und MITF-überexprimierender (MITF) Yumm1.1 gemessen mittels q-RT-PCR. HPRT diente als Referenzgen. Graue Felder zeigen Chemokine, welche unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Daten zeigen den Mittelwert der Target/Reference Ratio von mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten.

### 3.10 MITF-Überexpression in Yumm1.1 führt zu gesteigertem Tumorwachstum *in vivo*

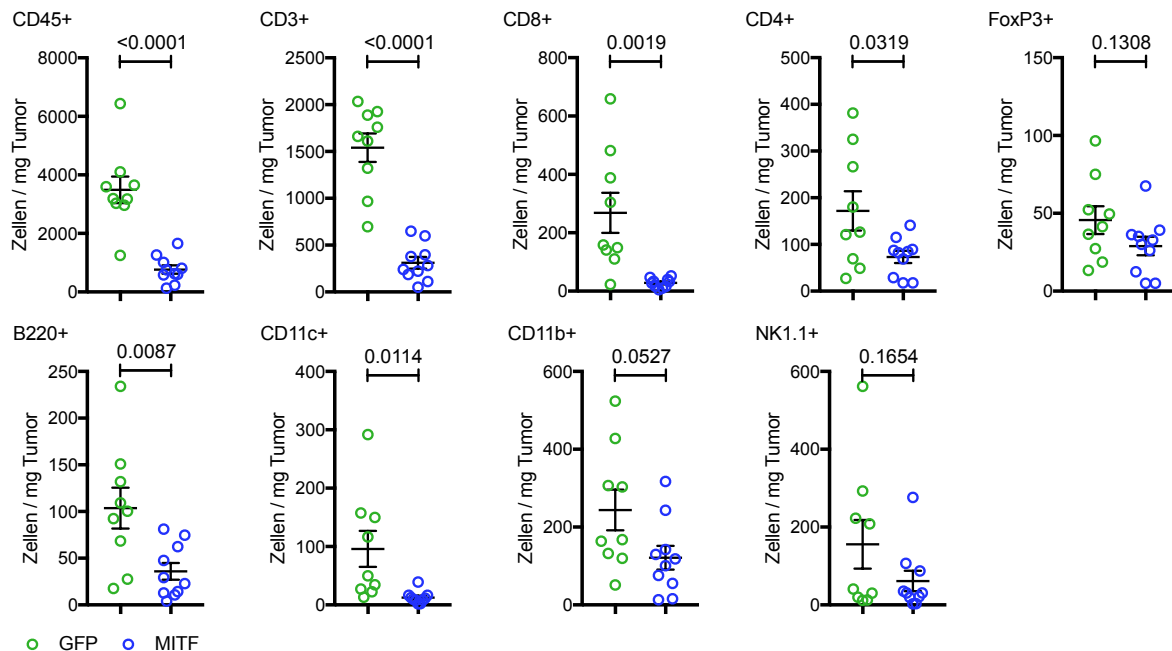
Um zu untersuchen, ob sich die *in vitro* Daten auch *in vivo* replizieren lassen, wurden die Yumm1.1-Melanomzellen subkutan in C57Bl/6-Mäuse injiziert und das Tumorwachstum beobachtet. Die MITF-transduzierten Tumorzellen zeigten ein beschleunigtes Tumorwachstum im Vergleich zu GFP-transduzierten Tumorzellen (Abbildung 15).



**Abb. 15: MITF-Überexpression in Yumm1.1 führt zu gesteigertem Tumorwachstum *in vivo*.** Tumorwachstum von GFP-transduzierten (GFP, n=9) oder MITF-transduzierten (MITF, n=10) Yumm1.1 nach subkutaner Injektion von  $2 \times 10^6$  Tumorzellen in die Flanke syngener C57Bl/6-Mäuse. Eine Kurve zeigt den Wachstumsverlauf des Tumors einer Maus, Daten gepoolt aus zwei unabhängigen Experimenten.

### 3.11 MITF-Überexpression in Yum1.1-Tumoren führt zu verringerter Immunzellinfiltration *in vivo*

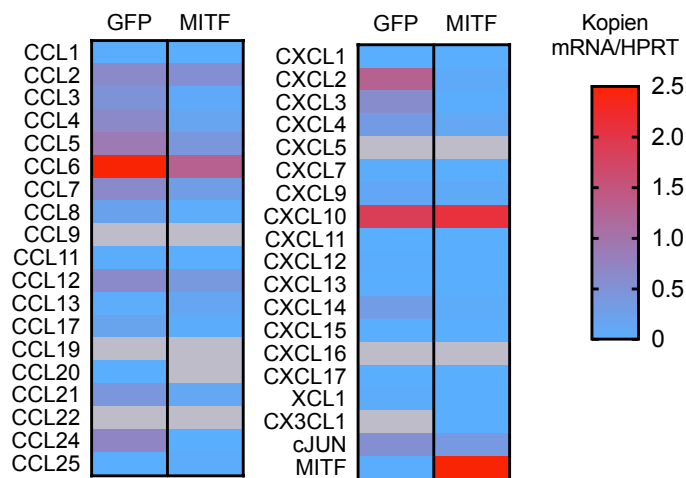
Als nächstes wurde die Immunzellinfiltration im Tumorgewebe der MITF- und kontrolltransduzierten Tumore untersucht. Dazu wurden alle Versuchstiere getötet, sobald eine Maus ein prädefiniertes tumorbezogenes Abbruchkriterium erreichte, die Tumoren entnommen und als Masse in Einzelzellsuspension mittels Durchflusszytometrie auf die wichtigsten Immunzellpopulationen untersucht. Die Zahl der CD45<sup>+</sup> Immunzellen, sowie im speziellen T-Lymphozyten (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>), dendritische Zellen (CD11c<sup>+</sup>) und B-Zellen (B220<sup>+</sup>) waren in den MITF-transduzierten Tumoren signifikant vermindert nachweisbar (Abbildung 16). Diese Verminderung an anti-tumoralen Effektorzellen im Tumorgewebe der MITF-überexprimierenden Tumore stellt eine potentielle Erklärung für das schnellere Tumorwachstum in dieser Gruppe dar. Die Infiltration durch myeloide Zellen (CD11b<sup>+</sup>) und NK-Zellen (NK1.1<sup>+</sup>) unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen, jedoch war auch hier ein Trend zur verminderten Migration in MITF-überexprimierende Tumore zu beobachten (Abbildung 16). A priori konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die MITF-überexprimierenden Tumoren möglicherweise pro-tumorale Immunzellen wie zum Beispiel T<sub>reg</sub> rekrutieren, weshalb die Tumoren auch auf CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Zellen untersucht wurden. Es konnte allerdings keine verstärkte Infiltration durch T<sub>reg</sub> in den MITF-überexprimierenden Tumoren nachgewiesen werden (Abbildung 16).



**Abbildung 16: MITF-Überexpression in Yum1.1-Tumoren führt zu verringerter Migration von Immunzellen ins Tumorgewebe *in vivo*.** FACS-basierte Quantifizierung von Immunzellen in explantierten Tumoren (aus Abbildung 15) am Tag des Versuchsabbruchs. Daten zeigen Zellen pro Gramm Tumorgewicht jeweils einer Maus aus zwei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei  $p < 0,05$ .

### 3.12 MITF-Überexpression in Yumm1.1-Tumoren führt zu verringerter Chemokinexpression im Tumorgewebe *in vivo*

Um festzustellen, ob die veränderte Migration von Immunzellen in die MITF-überexprimierenden Tumore durch ein entsprechend verändertes Chemokinprofil zu erklären ist, wurde auch hier die Chemokinexpression im explantierten Tumorgewebe untersucht. Im Vergleich zur GFP-Kontrollgruppe, welche kleinere Tumoren und eine stärkere Immunzellinfiltration zeigte, fand sich in MITF-überexprimierenden Tumoren eine signifikant verminderte Expression der Chemokine CCL3, CCL4, CCL6, CCL8, CCL11, CCL17, CCL24, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL7, CXCL12, CXCL14 und XCL1 (Abbildung 17). Allein für CCL25 wurde in den MITF-überexprimierenden Tumoren eine signifikant erhöhte Expression gemessen.



**Abbildung 17: MITF-Überexpression in Yumm1.1 führt zu verringerter Chemokinexpression im Tumorgewebe *in vivo*.** Heatmap der Chemokinexpression in den explantierten Tumoren der Versuche aus Abbildung 15. Bei Versuchsabbruch wurde ein Teil des Tumorgewebes zur RNA-Isolation verwendet. Chemokin-mRNA-Level wurden mittels q-RT-PCR gemessen, HPRT diente als Referenzgen. Ein Kästchen stellt den Mittelwert der Messungen der jeweils 7 (GFP) oder 10 (MITF) Tumoren dar. Graue Felder zeigen Chemokine unterhalb der Nachweisgrenze. Aus zwei GFP-Tumoren konnte aufgrund der geringen Tumorgroße keine suffiziente Menge an RNA gewonnen werden, daher wurden diese von der Analyse ausgeschlossen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Die Daten in dieser Arbeit zeigen, dass sowohl im humanen als auch im murinen Melanommodell eine Modulation der Expressionslevel des Transkriptionsfaktors MITF die Chemokinexpression der untersuchten Melanomzelllinien und die Immunzellmigration zu den konditionierten Tumorüberständen wie auch ins Tumorgewebe *in vivo* verändert. Im humanen Modell herrschte ein Einfluss auf die Migration myeloider (CD14<sup>+</sup>) Zellen vor. Durch MITF-Überexpression migrierten weniger CD14<sup>+</sup> Zellen zu den Tumorüberständen, durch MITF-*knockdown* wurden diese stärker angezogen. Die Analyse der Chemokinexpression der Melanomzelllinien erbrachte keine signifikanten Unterschiede, insgesamt schien jedoch die Überexpression von MITF die Chemokinexpression eher zu vermindern und der MITF-*knockdown* diese zu erhöhen. In der murinen Zelllinie stand der Einfluss von MITF auf die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen im Vordergrund. Dabei war auffällig, dass die *in vitro*- und *in vivo*-Versuche gegensätzliche Effekte zeigten. Die Überexpression von MITF führte *in vitro* zu einer gesteigerten Immunzellmigration und erhöhten Chemokinexpression, während *in vivo* die MITF-überexprimierenden Tumoren ein beschleunigtes Tumorwachstum mit verringerter Immunzellinfiltration und Chemokinexpression im Tumorgewebe zeigten.

### 4.2 Einfluss von MITF auf die Migration CD14<sup>+</sup> Zellen in den humanen Melanomzelllinien WM8 und WM35

Bereits Riesenberg *et al.* konnten zeigen, dass verringerte MITF-Level in Melanomzellen zu einer gesteigerten Migration myeloider Zellen führt (Riesenberg *et al.*, 2015). Passend hierzu konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch einen MITF-*knockdown* vermehrt CD14<sup>+</sup> Zellen zu den Überständen der Tumorzellen migrierten, wobei dieser Effekt in der Zelllinie WM35 nicht so prominent war wie in der Zelllinie WM8. Da aber in allen drei Wiederholungen der MITF-*knockdown*-Versuche mit WM35 ein klarer Trend hin zu gesteigerter Migration zu sehen war, mit nur knapper Verfehlung der statistischen Signifikanz (Abbildung 10), wird in dieser Arbeit in Zusammenschau mit den restlichen Ergebnissen auch hier von einem tatsächlichen Effekt ausgegangen. So zeigte beispielsweise die Überexpression von MITF in WM35 einen entsprechend gegenteiligen, statistisch signifikanten Effekt (Abbildung 6).

In den Versuchen dieser Arbeit wurden myeloide Zellen durch die Expression des Oberflächenproteins CD14 identifiziert. In der Literatur werden klassische Monozyten (CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup>) als die Vorläufer von TAM angesehen, welche regelhaft via CCL2 in den Tumor rekrutiert werden und dort *in situ* zu TAM differenzieren (Qian *et al.*, 2011, Olingy *et al.*, 2019). Die genauere Subcharakterisierung der CD14<sup>+</sup> Zellen durch die Bestimmung von CD16 ist in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgt, jedoch stellen die CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup> klassischen Monozyten in der Regel den



Hauptteil der CD14<sup>+</sup> Zellen dar (Wong *et al.*, 2012, Stansfield *et al.*, 2015). TAMs zeigen häufiger die immunsuppressive, pro-tumorale M2-Differenzierung, welche zur Invasivität und Metastasierung beitragen (Mantovani *et al.*, 2002, Torisu *et al.*, 2000, Qian *et al.*, 2011, Kitamura *et al.*, 2015, s. Kap. 1.5.1.2). Weiterhin konnte in der humanen Melanomzelllinie Mel501 bereits gezeigt werden, dass der *knockdown* von MITF zu einer vermehrten Expression von CCL2 in den Tumorzellen führt, welches deren Invasivität und Metastasierungsfähigkeit steigerte (Ohanna *et al.*, 2011). CCL2 wirkt außerdem chemotaktisch auf CD14<sup>+</sup> myeloide Zellen und rekrutiert diese ins Tumormilieu (s. Abbildung 3, Qian *et al.*, 2011, Nagarsheth *et al.*, 2017). Vor diesem Hintergrund ließe sich folglich die in dieser Arbeit gezeigte gesteigerte Migration CD14<sup>+</sup> myeloider Zellen zu MITF-depletierten Melanomzellen gut im bereits beschriebenen Kontext des invasiveren, MITF<sup>low</sup>-Phänotypen von Melanomen einordnen und lässt die Vermutung zu, dass die protumoralen Funktionen myeloider Zellen die Eigenschaften dieses Melanom-Phänotyps unterstützen. Dementsprechend könnten MITF<sup>low</sup>-Melanome besonders von Therapien profitieren, welche die tumorfördernden Eigenschaften myeloider Zellen modulieren.

Ein solcher therapeutischer Ansatz wäre beispielsweise die Blockade des CSF1-Rezeptors (CSF1-R). Der Ligand dieses Rezeptors, *Macrophage colony stimulating factor* (M-CSF), oder CSF1, ist ein wichtiger Stimulus für die Rekrutierung von TAMs ins Tumormikromilieu und deren Differenzierung in M2-polarisierte, immunsuppressive Makrophagen (Van Overmeire *et al.*, 2016, Zhu *et al.*, 2014, Fleetwood *et al.*, 2007). Die Blockade von CSF1-R verminderte die Extravasation, Proliferation und Differenzierung in den M2-Phänotyp von TAM und verminderte das Tumorstadium (Van Overmeire *et al.*, 2016, Pyonteck *et al.*, 2013). Während eine CSF1-R-Blockade alleine in vielen Studien für eine vollständige Tumorkontrolle nicht ausreichte, führte die Kombination einer CSF1-R-Blockade mit verschiedenen Therapieformen (Radio-, Chemo-, zielgerichtete und immunbasierte Therapien) in unterschiedlichen Tumorentitäten zu einer Verbesserung des Therapieansprechens (Engblom *et al.*, 2016).

Im Melanom konnte gezeigt werden, dass die CSF1-R-Inhibition einen Shift von M2- in M1-polarisierte Makrophagen induzierte und die Infiltration von T-Zellen in die Tumoren verbesserte, wodurch der therapeutische Effekt einer adoptiven T-Zell-Therapie signifikant verbessert wurde (Mok *et al.*, 2014). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass tumorinfiltrierende, aktivierte T-Zellen eine CSF1-Produktion in Melanomzellen induzierten (Neubert *et al.*, 2018). Die Kombination von CSF1R- mit PD1-Inhibition reduzierte sowohl die absolute Anzahl an TAMs, als auch deren immunsuppressiven Eigenschaften, und konnte so den Effekt einer anti-PD1-Therapie signifikant steigern (Neubert *et al.*, 2018). Diese Formen der Kombinationstherapie könnten dementsprechend besonders in MITF<sup>low</sup>-Melanomen vorteilhaft sein.

#### 4.3 Einfluss der MITF-Überexpression auf Migration von CD19<sup>+</sup> Zellen in WM8 und WM35

Die Überexpression von MITF führte in beiden humanen Zelllinien zu einer signifikant verringerten *in vitro*-Migration von CD19<sup>+</sup> B-Zellen zu den konditionierten Tumorüberständen (Abbildung 5 und 6). Als wichtige Effektorzellen der humoralen Immunität sind sie wesentlicher Bestandteil der adaptiven Immunantwort gegen verschiedenste Pathogene (LeBien *et al.*, 2008). Im Kontext einer anti-tumoralen Immunantwort ist die Rolle von B-Zellen jedoch noch nicht so gut erforscht wie die von T-Zellen. Griss *et al.* haben anhand der Expression verschiedener Oberflächenproteine unterschiedliche B-Zell-Subpopulationen differenziert, welche in Patientenproben metastatischer Melanome nachweisbar waren (Griss *et al.*, 2019). Das Vorhandensein einer bestimmten B-Zell-Population korrelierte dabei mit der tumorspezifischen Inflammation und konnte das Therapie-Ansprechen auf Immuncheckpoint-Blockade vorhersagen (Griss *et al.*, 2019). Andererseits wurden in der Literatur vielfach pro-tumorale Subtypen beschrieben, darunter sog. regulatorische B-Zellen, welche durch Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 oder *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  eine effektive anti-tumorale T-Zell-Antwort inhibieren (Inoue *et al.*, 2006, Sarvaria *et al.*, 2017). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Tumor-infiltrierende B-Zellen in Melanomzellen eine Therapieresistenz gegen BRAF- und MEK-Inhibitoren induzierten (Somasundaram *et al.*, 2017). Für diese unterschiedlichen Beobachtungen scheinen sowohl das Ausmaß der B-Zell-Aktivierung als auch deren Differenzierungsgrad eine wichtige Rolle zu spielen, welche in der Erforschung des Einflusses von B-Zellen in der Tumorummunologie besonders berücksichtigt werden müssen (Nelson, 2010, Griss *et al.*, 2019).

#### 4.4 Einfluss des MITF-*knockdown* auf Migration von NK-Zellen in WM8 und WM35

In den humanen Melanomzelllinien konnte eine gesteigerte Migration von NK-Zellen hin zu den Tumorüberständen der MITF-depletierten Melanomzellen beobachtet werden (Abbildung 9 und 10). NK-Zellen gehören neben T-Zellen zu den Haupteffektorzellen einer antitumoralen Immunantwort, können jedoch häufig nicht in größeren Mengen im Tumorgewebe selbst nachgewiesen werden (Morvan *et al.*, 2016, Smyth *et al.*, 2002). Cursons *et al.* entwickelten durch Analyse von Einzelzell-RNA-Sequenzierungen aus der *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)-Datenbank einen Score, welcher die Infiltration von Melanomen mit NK-Zellen voraussagen konnte und mit einem verbessertem Überleben der Patienten korrelierte (Cursons *et al.*, 2019). Sie fanden außerdem heraus, dass die Gene des NK-Zell-Scores stärker in MITF<sup>low</sup>-Melanomzelllinien exprimiert wurden, was suggeriert, dass NK-Zellen stärker in MITF<sup>low</sup>-Melanomen infiltrieren, wie es auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte. Demzufolge lässt sich spekulieren, dass Patienten mit MITF<sup>low</sup>-Melanomen möglicherweise besonders von einer NK-Zell-basierten Immuntherapie profitieren könnten. Dies ist insbesondere relevant, da kürzlich gezeigt werden konnte, dass MITF<sup>low</sup>-Melanome mit einer MHC-I-Herunterregulation assoziiert sind und folglich schlechter auf

die überwiegend von einer T-Zell-Antwort abhängige Checkpoint-Inhibitor-Therapie ansprechen (Lee *et al.*, 2020). NK-Zellen hingegen sind besonders geeignet, MHC-negative Zellen zu erkennen und zu zerstören (s. Kap. 1.5.2, Morvan *et al.*, 2016).

#### 4.5 Einfluss des MITF-*knockdown* auf Migration von CD4<sup>+</sup> Zellen in WM35

In der Zelllinie WM35 konnte im Gegensatz zur Zelllinie WM8 in zwei der drei Wiederholungen eine signifikant gesteigerte Migration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 10). Die Zelllinie WM35 verfügt anders als die Zelllinie WM8 über die onkogene <sup>V600E</sup>BRAF-Mutation, WM8 hingegen besitzen Wildtyp-BRAF (Smalley *et al.*, 2008). In der Literatur ist beschrieben, dass <sup>V600E</sup>BRAF die Rekrutierung T<sub>reg</sub> kontrollieren kann (Shabaneh *et al.*, 2018). T<sub>reg</sub> gelten als eine immunsuppressive T-Zellpopulation, welche physiologisch eine Immunantwort gegen Selbst-Antigene verhindern soll. Sie exprimieren ebenfalls den Marker CD4 werden häufig im Tumormikromilieu nachgewiesen, durch Unterdrückung der lokalen antitumoralen Immunantwort fördern sie im Allgemeinen eine Tumorprogression (Togashi *et al.*, 2019). Normalerweise machen T<sub>reg</sub> nur etwa 5-10 % der CD4<sup>+</sup> Population peripherer T-Zellen aus (Zou, 2006), da sie sich aber im Tumormilieu anreichern, ist denkbar, dass es sich bei der hier verstärkt zu MITF-depletierten WM35-Melanomzellen migrierten CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation um T<sub>reg</sub> handeln könnte. T<sub>reg</sub> werden durch die Expression von CD25 und FoxP3 charakterisiert (Zou, 2006), welche in den *in vitro*-Migrationsversuchen dieser Arbeit nicht bestimmt wurden. Somit bleibt unklar, ob die durch MITF-*knockdown* gesteigerte Migration CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche nur in der <sup>V600E</sup>BRAF-mutierten Zelllinie gefunden werden konnte, tatsächlich mit der von <sup>V600E</sup>BRAF initiierten Rekrutierung von T<sub>reg</sub> (Shabaneh *et al.*, 2018) zusammenhängt. Zusammen mit der Beobachtung, dass MITF<sup>low</sup> Melanome vermehrt von tumorfördernden myeloiden Zellen infiltriert werden (s. Kap. 4.2), würde eine Rekrutierung immunsuppressiver T<sub>reg</sub> die Ausprägung des aggressiven Phänotyps unterstützen.

#### 4.6 Einfluss der MITF-Überexpression auf die Chemokinexpression in WM8 und WM35

Um eine Erklärung für die verminderte Migration von CD14<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Zellen nach MITF-Überexpression zu finden, wurde die Chemokinexpression in den MITF-überexprimierenden Melanomzelllinien auf mRNA-Ebene untersucht. CCL2 und CXCL12 sind bekannt dafür, jeweils CD14<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Zellen in das Tumormilieu zu rekrutieren (Nagarsheth *et al.*, 2017). Nach Überexpression von MITF zeigte sich für CCL2 zwar eine reduzierte, aber nicht signifikant verminderte Expression, während CXCL12 unabhängig von der MITF-Expression in beiden Zelllinien nicht nachweisbar war (Abbildung 7). Es wurde bereits gezeigt, dass mRNA-Level von Cytokinen oder Chemokinen nicht immer mit deren Protein-Expression korrelieren (Shebl *et al.*, 2010). Es ist daher möglich, dass die biologisch aktiven Proteine tatsächlich vermindert im Überstand der MITF-überexprimierenden Melanomzellen vorhanden waren. Bei Analyse aller

anderen gemessenen Chemokine fand sich eine dezente, ebenfalls nicht signifikante Verminderung der Chemokine CXCL16 in beiden Zelllinien, sowie CCL18 in WM35.

#### 4.7 Einfluss des MITF-*knockdown* auf die Chemokinexpression in WM8 und WM35

Die Analyse der Chemokin-mRNA-Expression nach MITF-*knockdown* in den humanen Zelllinien konnte auch hier keinen klaren Aufschluss über das beobachtete Migrationsverhalten liefern. Nach MITF-*knockdown* in WM8 konnte für CCL2, CXCL1 und CXCL2 eine nicht signifikant, aber leicht erhöhte mRNA-Expression nachgewiesen werden. Wie bereits oben erwähnt, ist es möglich, dass in den Überständen dennoch ein biologisch relevanter Unterschied der Chemokine auf Proteinebene bestand, welche die beobachtete Migration induziert haben könnten. Andererseits ist es möglich, dass andere, in dieser Arbeit nicht bestimmte Faktoren, am beobachteten Effekt beteiligt waren. CCL2 ist als potenter Chemoattraktor für myeloide Zellen ins Tumormilieu bekannt (Nagarsheth *et al.*, 2017, Qian *et al.*, 2011). Für CXCL1 und CXCL2 hingegen wurde zwar eine wichtige Rolle in der Tumorgenese und Angiogenese im Melanom beschrieben (Dhawan *et al.*, 2002, Luan *et al.*, 1997), allerdings scheinen sie bezüglich Migration eher eine Rolle in der Rekrutierung von MDSC zu spielen (Nagarsheth *et al.*, 2017).

Interessanterweise konnte nach MITF-*knockdown* sowohl in WM8 als auch in WM35 eine verringerte Menge an CCL15- und CCL18-mRNA gemessen werden. Beide Chemokine sind aktuell nicht bekannt dafür, eine wesentliche Rolle in der Tumorummunologie des Melanoms zu spielen, jedoch sind für beide pro-angiogenetische Aktivität beschrieben worden (Hwang *et al.*, 2004, Lin *et al.*, 2015). Lin *et al.* konnten zeigen, dass CCL18 aus Tumor-assoziierten Makrophagen synergistisch mit *vascular endothelial growth factor* (VEGF) die Angiogenese in Brustkrebs förderte (Lin *et al.*, 2015). Harlin *et al.* beschreiben in einem Fallbericht einen Patienten mit metastasiertem Melanom, in dessen malignen Aszites CCL15 und CCL18 nachgewiesen werden konnte (Harlin *et al.*, 2006). Im hier präsentierten Kontext der gesteigerten Migration der Immunzellen hin zu den Tumorüberständen lassen sich diese pro-angiogenetischen Eigenschaften von CCL15 und CCL18 jedoch nicht klar einordnen. Wie bereits beschrieben, haben Chemokine häufig mehr Funktionen als nur die Koordination der Immunzellmigration. Es wäre denkbar, dass MITF durch den Einfluss auf pro-angiogenetische Chemokine die Angiogenese in Melanomen modulieren könnte.

#### 4.8 MITF-Überexpression in der murinen Melanomzelllinie Yumm1.1 führt zu veränderter Chemokinexpression und zur Rekrutierung entsprechender Immunzellen

In dieser Arbeit wurde im murinen Melanommodell die Zelllinie Yumm1.1 verwendet. Die Zelllinie wurde als gentechnisch verändertes Mausmodell entwickelt und soll die relevanten Mutationen aus humanen Melanomen tragen, entsprechend verfügen Yumm1.1 unter anderem über eine aktivierende <sup>V600E</sup>BRAF-Mutation (Meeth *et al.*, 2016, Davies *et al.*, 2002). Sie wurde von den

Autoren als wenig immunogen charakterisiert, immunhistochemisch waren in subkutan injizierten Tumoren weniger als 1 % der CD45<sup>+</sup> Leukozyten CD3<sup>+</sup> T-Zellen, die Mehrzahl der intratumoralen Leukozyten waren F4/80<sup>+</sup> Makrophagen (Meeth *et al.*, 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die retrovirale Überexpression von MITF in Yumm1.1 *in vitro* zu einer gesteigerten Migration von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie von NK-Zellen führt. Passend hierzu konnte in den MITF überexprimierenden Tumorzellen *in vitro* eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression der Chemokine CCL5 und CXCL10 nachgewiesen werden, welche als Chemoattraktoren für T- und NK-Zellen bekannt sind (Mgirditchian *et al.*, 2017, Wendel *et al.*, 2008, Luster *et al.*, 1993) und das beobachtete Migrationsmuster erklären können. Sowohl T- als auch NK-Zellen sind potente antitumorale Effektorzellen, welche maßgeblich an der Immunantwort gegen Tumorzellen beteiligt sind (Saudemont *et al.*, 2005, Harlin *et al.*, 2009, s. Kap. 1.4.2. und Kap. 1.5.2). Somit suggerieren die *in vitro* Ergebnisse, dass eine gesteigerte MITF-Expression zu einer vermehrten Infiltration anti-tumoraler Effektorzellen führt, welche eine bessere Tumorkontrolle ermöglichen sollte.

Interessanterweise zeigte sich im *in vivo*-Modell der Yumm1.1-Melanomzellen jedoch ein gegenteiliger Effekt zu den *in vitro* beobachteten Ergebnissen. Die Tumoren der MITF-überexprimierenden Yumm1.1 wuchsen schneller und zeigten eine signifikant verminderte Immunzellinfiltration, welche vor allem CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, dendritische Zellen und B-Zellen betraf. Dies wurde von einer signifikant verminderten Chemokinexpression im Tumorgewebe der MITF-überexprimierenden Tumoren begleitet. Die Chemokine CCL3, CCL4, CCL6, CCL8, CXCL4 und CXCL12, welche in den MITF-überexprimierenden Tumoren vermindert nachweisbar waren, binden u.a. an die Chemokin-Rezeptoren CCR5, CCR8, CCR4, CXCR3 und CXCR4 (s. Abbildung 3), welche u.a. von aktivierten murinen T-Zellen exprimiert werden (Hughes *et al.*, 2018). Auch CD11c<sup>+</sup> dendritische Zellen exprimieren u.a. CCR5, CXCR4 und XCR1 und werden durch CCL3, CCL4, CXCL12 und XCL1 angezogen. Murine B-Zellen exprimieren neben CCR5, CXCR3 und CXCR4 auch CCR1, CXCR2 und CXCR7, welche die entsprechenden Chemokine CCL3, CCL4, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL7 und CXCL12 binden (Hughes *et al.*, 2018). Diese Liganden-Rezeptor-Bindungen und die Rezeptorexpression der Tumor-infiltrierenden Leukozyten bieten demnach eine sinnvolle Erklärung für das beobachtete Migrationsverhalten. Diese Interaktionen werden in Abbildung 3 noch einmal veranschaulicht. *In vivo* scheint also eine gesteigerte Expression von MITF zu einer verminderten Immunzellinfiltration mit schlechterer Tumorkontrolle zu führen. Dies könnte möglicherweise eine Erklärung für die Beobachtung darstellen, dass MITF<sup>low</sup>-Melanome zwar mit einer gesteigerten Invasivität und Metastasierung assoziiert sind, MITF<sup>high</sup>-Melanome jedoch stärker proliferieren und häufiger mit einem schlechteren Outcome korrelieren (Garraway *et al.*, 2005, Arozarena *et al.*, 2019).

CCL25 war das einzige Chemokin, welches in den MITF-überexprimierenden Tumoren stärker nachweisbar war als in der Kontrollgruppe. CCL25 bindet an CCR9, ein Chemokinrezeptor, der von einer Vielzahl von Tumoren exprimiert wird (Tu *et al.*, 2016), darunter auch Melanome (Seidl *et al.*, 2007). Der CCR9-CCL25-Achse wird insbesondere im Melanom eine wichtige Rolle für die intestinale Metastasierung zugesprochen (Letsch *et al.*, 2004, Amersi *et al.*, 2008), dabei sollen CCR9-exprimierende Tumorzellen durch CCL25 aus intestinalen T-Zellen angelockt werden. In einem Tumormodell zum Pankreas-Karzinom wurde gezeigt, dass die CCR9-CCL25-Achse durch Aktivierung des  $\beta$ -catenin- und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Akt-Signalwegs die Tumorprogression fördert (Lee *et al.*, 2015). Sollten Yumm1.1 ebenfalls CCR9 exprimieren, könnte hier möglicherweise eine interessante autostimulatorische Rückkopplung vorliegen, durch welche sich die Tumorzellen durch selbstständige Produktion des Liganden CCL25 ein unabhängiges Progressionssignal senden.

#### 4.9 MITF-Überexpression in Yumm1.1 führt zu unterschiedlichen Effekten *in vivo* und *in vitro*

Im *in vitro*-Modell der Yumm1.1 führte eine Überexpression von MITF zu einer verstärkten Rekrutierung von anti-tumoralen Immunzellen, welche von einer verstärkten Chemokinexpression begleitet wurde. *In vivo* wuchsen jedoch die MITF-überexprimierenden Tumoren schneller und zeigten eine deutlich verminderte Infiltration von Immunzellen. Hierbei konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um immunsuppressive Zellpopulationen wie T<sub>reg</sub> handelte (s. Abbildung 16). Nicht nur unterschied sich der beobachtete Effekt als solches, auch die rekrutierten Zellpopulationen differierten zwischen den experimentellen Ansätzen. *In vivo* konnten außerdem deutlich mehr signifikant verminderte Chemokine im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Für die beobachteten Unterschiede zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnissen kommen mehrere Erklärungen in Betracht. Hierbei ist insbesondere der Einfluss des Tumormilieus hervorzuheben.

Das Tumorstroma aus Immunzellen, Fibroblasten, Endothelien, extrazellulärer Matrix und löslichen Faktoren beeinflussen die Biologie eines Tumors in vielerlei Hinsicht (Ju *et al.*, 2018, Villanueva *et al.*, 2008). Die nicht-malignen Zellen im Tumor sezernieren ebenfalls Zytokine und Chemokine, welche die Rekrutierung, Differenzierung und den Aktivitätsstatus der Immunzellen im Tumor beeinflussen (Hanahan *et al.*, 2012, Fridman *et al.*, 2012). Hierzu ist bekannt, dass Immunzellen und Tumorzellen im Tumorstroma wechselseitig aufeinander einwirken (Hanahan *et al.*, 2012). Eine durch T-Zell-Therapie hervorgerufenen Inflammation im Tumorgewebe induzierte in Melanomzellen einen Verlust von melanozytären Antigenen (im Sinne einer Selektion Antigen-defizienter Tumorzellen (Jäger *et al.*, 1996, Khong *et al.*, 2004)) und dadurch eine Umwandlung von differenzierten in dedifferenzierte Melanomzellen. Dieser *phenotype switch* war durch die Zugabe oder Inhibition von Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$  reversibel (Landsberg *et al.*, 2012).

Durch ein Netz von Blutgefäßen im Tumor *in vivo* werden innerhalb des Tumorgewebes verschiedene Bereiche geschaffen, in denen die tumorbildenden Zellen unterschiedlich mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden (Haass *et al.*, 2014). Dadurch organisieren sich Melanomzellen innerhalb des Tumors in verschiedenen Kompartimenten, die Autoren konnten zeigen, dass Tumorzellen in der Peripherie, welche nah an den Blutgefäßen lagen, proliferierten, während Tumorzellen im Zentrum des Tumors einem G1-Zellzyklusarrest unterlagen (Haass *et al.*, 2014). Diese Sauerstoff- und Nährstoff-Minderversorgung einer Population von Tumorzellen kann ebenfalls einen *phenotype switch* induzieren (Widmer *et al.*, 2013, Haass *et al.*, 2014, Arozarena *et al.*, 2019). Tirosh *et al.* gelang durch Analyse von Einzelzell-RNA-Sequenzierung von metastatischen Melanomen der Nachweis, dass Tumorzellen innerhalb eines Tumors unterschiedliche transkriptionelle Programme aufwiesen, sodass Tumoren, welche insgesamt als MITF<sup>high</sup> charakterisiert wurden, ebenfalls einzelne Tumorzellen enthielten, die wenig MITF exprimierten. Diese unterschieden sich unter anderem in Zellzyklus-Regulation, dem Ansprechen auf MAPK-Inhibitoren, sowie in den Zell-Zell-Interaktionen im Tumorstroma (Tirosh *et al.*, 2016).

Dieser Einfluss des Mikromilieus auf die intratumorale Heterogenität konnte in der *in vitro* Zellkultur der vorliegenden Arbeit nicht nachgebildet werden. Da bei der Aufbereitung des Tumorgewebes der *in vivo*-Experimente dieser Arbeit der Tumor als Ganzes, nach Herstellung einer Einzelzellsuspension, auf Immunzellen und Chemokinexpression untersucht wurde, lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht ableiten, welche Zellen die Quelle der Chemokine waren. So ist es möglich, dass die Tumorzellen ihre Chemokinexpression im *in vivo*-Setting verändert haben, oder aber dass die hier gemessenen Chemokine mindestens teilweise von den Stromazellen produziert wurden, welche direkt oder indirekt durch die veränderten MITF-Level der Tumorzellen beeinflusst wurden. Die Ergebnisse der Experimente zeigen in jedem Fall, dass eine Überexpression von MITF in Yumm1.1 die Chemokinexpression im Tumorgewebe und die Immunzellmigration *in vivo* verändert. Die unterschiedlichen Beobachtungen in den *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten legen nahe, dass die MITF-Überexpression in den Tumorzellen einen Einfluss auf das Tumormilieu und die umliegenden Zellen hat und dies nicht unerheblich am beobachteten Effekt beteiligt ist.

#### 4.10 Einfluss von MITF auf die Rekrutierung von dendritischen Zellen ins Tumormilieu

Wie bereits besprochen, konnten in den MITF-überexprimierenden Yumm1.1-Tumoren neben CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch eine gesteigerte Infiltration von dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Dendritische Zellen (DC) sind professionelle antigenpräsentierende Zellen, welche im Gewebe patrouillieren und bei Antigenkontakt in den Lymphknoten migrieren, um dort das adaptive Immunsystem zu aktivieren. Im Kontext der Tumorthherapie wurde ihr Potenzial zunächst durch Ansätze wie DC-Vakzine genutzt (Santos *et al.*, 2018), ihre bestehende Relevanz in neueren

Therapieformen wurde jedoch bald deutlich. Es konnte gezeigt werden, dass die Präsenz von dendritischen Zellen im Tumorgewebe und deren Fähigkeit, das initiale T-Zell-Priming gegen Tumor-assoziierte Antigene zu induzieren, essenziell ist für eine effektive T-Zell-Infiltration in den Tumor (Spranger *et al.*, 2015). Die Autoren konnten demonstrieren, dass die tumorzellintrinsic Aktivität des  $\beta$ -catenin-Signalwegs zu einer reduzierten Expression von CCL4 in den Tumorzellen führte, welches eine verminderte Rekrutierung von dendritischen Zellen in den Tumor zur Folge hatte (Spranger *et al.*, 2015). Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass in einem Modell mit stabilisierter  $\beta$ -catenin-Expression und folglich fehlender Rekrutierung von dendritischen Zellen in den Tumor, eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren keine Wirksamkeit zeigte. Auch im *in vivo* Modell der vorliegenden Arbeit konnte in den MITF-überexprimierenden Yumm1.1-Tumoren eine verminderte Expression von CCL4 und eine verminderte Infiltration dendritischer Zellen nachgewiesen werden. Ebenfalls ist bekannt, dass MITF ein essentielles *downstream target* des  $\beta$ -catenin-Signalweges ist (Widlund *et al.*, 2002). Daher ist denkbar, dass MITF in den Mechanismus der  $\beta$ -catenin-vermittelten Herunterregulation von CCL4 in Melanomzellen involviert sein könnte. Die Charakterisierung der genauen Mechanismen, welche für die verminderte Expression von CCL4 *downstream* von  $\beta$ -catenin verantwortlich sind, können möglicherweise helfen, immunologisch „kalte Tumoren“ in „*hot tumors*“ zu konvertieren.

#### 4.11 Abschließender Ausblick: Einfluss von MITF auf die Immunzellinfiltration von Melanomen

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Charakterisierung von Melanomen aufgrund einer beachtlichen Heterogenität, komplexen Regulationsmechanismen und der plastischen Anpassungsfähigkeit an Umwelteinflüsse keine leichte Aufgabe ist. Der Transkriptionsfaktor MITF ist maßgeblich für Proliferation, Überleben und Differenzierung von Melanozyten verantwortlich (Cheli *et al.*, 2010), seine Funktionen spielen bei der Transformation in maligne Melanomzellen eine wichtige Rolle. Immer umfangreichere technische Methoden und weltweit zugängliche Daten und Datensätze zum Genom von Tumoren ermöglichten bemerkenswerte Analysen und neue Erkenntnisse zu den Gemeinsamkeiten und Besonderheiten bestimmter Tumorentitäten und legten den Grundstein für neue Therapieansätze.

Das Melanom ist ein besonders immunogener Tumor. Als Grund dafür wird u.a. angenommen, dass die kontinuierliche Exposition gegenüber DNA-schädigender UV-Strahlung zu überdurchschnittlich vielen Mutationen und folglich Expression von Neoantigenen führt, welche vom Immunsystem erkannt werden können (Byrne *et al.*, 2017). Man geht davon aus, dass insbesondere deshalb die immunbasierten Therapien im Melanom so herausragende Erfolge verzeichnen konnten. Legt man der Krebsentstehung das Konzept des *Cancer Immunoediting* zugrunde, ist das Immunsystem allerdings auch maßgeblich daran beteiligt, durch Aufrechterhaltung eines Selektionsdrucks insbesondere solche Tumorzellen hervorzubringen, die



besonders geeignet sind, dem Immunsystem auf unterschiedliche Art und Weise zu entkommen (Dunn *et al.*, 2002).

Man kann innerhalb von soliden Tumoren tatsächlich ganz unterschiedliche Zellen detektieren, welche unterschiedliche Differenzierungsprogramme, Rezeptorexpression, Signalwege und Medikamentenresistenzen aufweisen (Tirosh *et al.*, 2016, Arozarena *et al.*, 2019). Häufig können diese verschiedenen Phänotypen bestimmten Regionen in einem Tumor zugeordnet werden. So ist zum Beispiel in Melanom beschrieben worden, dass Tumorzellen am peripheren Rand nahe den Blutgefäßen hohe Level an MITF exprimieren, während die Tumorzellen im hypoxischen Zentrum nur noch wenige Mengen MITF aufweisen und einen dedifferenzierteren Phänotyp annehmen (Hoek *et al.*, 2008, Haass *et al.*, 2014). Der Zugang zu Nährstoffen und Sauerstoff übt eine weitere Form des Selektionsdrucks auf die Tumorzellen aus, sodass innerhalb eines Tumors regelmäßig ein heterogenes Spektrum an Tumorzellen zu finden ist (Bai *et al.*, 2019). Auch die Immunzellinfiltration innerhalb von Tumoren und in Metastasen desselben Patienten können sich unterscheiden (Erdag *et al.*, 2012, Tirosh *et al.*, 2016).

Da gezeigt werden konnte, dass das Ausmaß (Erdag *et al.*, 2012) und die prä- sowie intratherapeutische Lokalisation (Tumeh *et al.*, 2014) der infiltrierenden Immunzellen im malignen Melanom mit dem Therapieansprechen auf Immuncheckpoint-Blockade korrelieren, ist es wichtig herauszufinden, welche Faktoren die Immunzellinfiltration beeinflussen und welche Möglichkeiten bestehen, diese gezielt zu verbessern.

## 5 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor MITF reguliert in Melanozyten eine Reihe an wichtigen Funktionen, darunter Zellzyklusprogression, Zellüberleben und Differenzierung. Das maligne Melanom geht aus Melanozyten hervor und ist die tödlichste Form des Hautkrebs. In der Therapie des malignen Melanoms konnten durch Immuncheckpoint-Therapien herausragende Erfolge erzielt werden, wodurch die zentrale Rolle des Immunsystems in der Melanomtherapie verdeutlicht wurde. Bisher ist noch sehr wenig über die Interaktion zwischen MITF und dem Immunsystem bekannt. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Einfluss von MITF auf die Chemokinexpression und Immunzellinfiltration im humanen und murinen Melanommodell untersucht.

Durch retrovirale Überexpression von MITF in humanen Melanomzelllinien konnte in Transwell-Migration-Assays eine verringerte Migration CD14<sup>+</sup> Zellen zu den konditionierten Tumorzellüberständen beobachtet werden. Passend hierzu zeigte sich nach MITF-*knockdown* eine verstärkte Migration CD14<sup>+</sup> Zellen. Die Analyse der Chemokin-mRNA-Expression der Melanomzelllinien konnte dabei allerdings keine hinreichende Erklärung für die beobachtete Migration liefern. Im murinen Modell wurde durch die MITF-Überexpression *in vitro* insbesondere die mRNA-Expression der Chemokine CCL5 und CXCL10 gesteigert, passend hierzu konnte eine verstärkte Migration von T- und NK-Zellen zu den Tumorzellüberständen beobachtet werden. *In vivo* zeigte sich allerdings ein gegenteiliger Effekt mit verringerter Chemokin-mRNA-Expression in MITF-überexprimierenden Tumoren. Entsprechend konnten in der durchflusszytometrischen Analyse dieser Tumoren weniger Immunzellen nachgewiesen werden und das Tumorwachstum zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe beschleunigt.

Die Experimente dieser Arbeit konnten zeigen, dass durch eine Veränderung der MITF-Level in verschiedenen Melanomzelllinien die Immunzellinfiltration und Chemokinexpression beeinflusst werden. Die teils unterschiedlichen Ergebnisse in den verschiedenen Modellen sind möglicherweise auf unterschiedliche Driver-Mutationen oder das jeweilige experimentelle Set-Up (Zellkultur vs. Tumorstroma *in vivo*) zurückzuführen. Die plastische Anpassungsfähigkeit an Umwelteinflüsse wie auch die inter- und intratumorale Heterogenität spielen in der Tumorbilogie des Melanoms bekanntermaßen eine wichtige Rolle und beeinflussen die Funktion von MITF. Die Daten dieser Arbeit tragen dazu bei, die Interaktion zwischen MITF und dem Immunsystem besser zu charakterisieren. Während der genaue Zusammenhang zwischen der MITF-Expression und der Immunzellinfiltration im malignen Melanom komplex zu sein scheint, könnte ein besseres Verständnis dieser Interaktion in Zukunft therapeutisch nützlich sein.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahmed F, Haass NK. Microenvironment-driven dynamic heterogeneity and phenotypic plasticity as a mechanism of melanoma therapy resistance. *Frontiers in Oncology* 2018; 8:173.
- Amersi FF, Terando AM, Goto Y, Scolyer RA, Thompson JF, Tran AN, Faries MB, Morton DL, Hoon DS. Activation of CCR9/CCL25 in cutaneous melanoma mediates preferential metastasis to the small intestine. *Clinical Cancer Research* 2008; 14:638-45.
- Arozarena I, Wellbrock C. Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nature Reviews: Cancer* 2019; 19:377-91.
- Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, Abrams J, Sznol M, Parkinson D, Hawkins M, Paradise C, Kunkel L, Rosenberg SA. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *Journal of Clinical Oncology* 1999; 17:2105-16.
- Bai X, Fisher DE, Flaherty KT. Cell-state dynamics and therapeutic resistance in melanoma from the perspective of MITF and IFN $\gamma$  pathways. *Nature Reviews: Clinical Oncology* 2019; 16:549-62.
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285:727.
- Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, Strub T, de Lichy M, Bille K, Dessen P, d'Hayer B, Mohamdi H, Remenieras A, Maubec E, de la Fouchardiere A, Molinie V, Vabres P, Dalle S, Poulalhon N, Martin-Denavit T, Thomas L, Andry-Benzaquen P, Dupin N, Boitier F, Rossi A, Perrot JL, Labeille B, Robert C, Escudier B, Caron O, Brugieres L, Saule S, Gardie B, Gad S, Richard S, Couturier J, Teh BT, Ghiorzo P, Pastorino L, Puig S, Badenas C, Olsson H, Ingvar C, Rouleau E, Lidereau R, Bahadoran P, Vielh P, Corda E, Blanche H, Zelenika D, Galan P, French Familial Melanoma Study G, Aubin F, Bachollet B, Becuwe C, Berthet P, Bignon YJ, Bonadona V, Bonafe JL, Bonnet-Dupeyron MN, Cambazard F, Chevrant-Breton J, Coupier I, Dalac S, Demange L, d'Incan M, Dugast C, Faivre L, Vincent-Fetita L, Gauthier-Villars M, Gilbert B, Grange F, Grob JJ, Humbert P, Janin N, Joly P, Kerob D, Lasset C, Leroux D, Levang J, Limacher JM, Livideanu C, Longy M, Lortholary A, Stoppa-Lyonnet D, Mansard S, Mansuy L, Marrou K, Mateus C, Maugard C, Meyer N, Nogues C, Souteyrand P, Venat-Bouvet L, Zattara H, Chaudru V, Lenoir GM, Lathrop M, Davidson I, Avril MF, Demenais F, Ballotti R, Bressac-de Paillerets B. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* 2011; 480:94-8.
- Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, Bottazzi B, Doni A, Vincenzo B, Pasqualini F, Vago L, Nebuloni M, Mantovani A, Sica A. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 2006; 107:2112-22.
- Boni A, Cogdill AP, Dang P, Udayakumar D, Njauw CN, Sloss CM, Ferrone CR, Flaherty KT, Lawrence DP, Fisher DE, Tsao H, Wargo JA. Selective BRAFV600E inhibition enhances T-cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte function. *Cancer Research* 2010; 70:5213-9.
- Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthi S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *New England Journal of Medicine* 2012; 366:2455-65.

Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, Mandruzzato S, Murray PJ, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Rodriguez PC, Sica A, Umansky V, Vonderheide RH, Gabrilovich DI. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications* 2016; 7:12150.

Burnet FM. Immunological surveillance in neoplasia. *Immunological Reviews* 1971; 7:3-25.

Byrne EH, Fisher DE. Immune and molecular correlates in melanoma treated with immune checkpoint blockade. *Cancer* 2017; 123:2143-53.

Carreira S, Goodall J, Aksan I, La Rocca SA, Galibert M-D, Denat L, Larue L, Goding CR. Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature* 2005; 433:764-9.

Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS, Testori A, Larue L, Goding CR. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes and Development* 2006; 20:3426-39.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AMM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *New England Journal of Medicine* 2011; 364:2507-16.

Cheli Y, Giuliano S, Fenouille N, Allegra M, Hofman V, Hofman P, Bahadoran P, Lacour JP, Tartare-Deckert S, Bertolotto C, Ballotti R. Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells. *Oncogene* 2012; 31:2461-70.

Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Research* 2010; 23:27-40.

Chow MT, Luster AD. Chemokines in cancer. *Cancer Immunology Research* 2014; 2:1125-31.

Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1991:3-11.

Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wölfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora JP, Renauld JC, Boon T. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *Journal of Experimental Medicine* 1994; 180:35-42.

Cursons J, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Foroutan M, Anderson A, Hollande F, Hediye-Zadeh S, Behren A, Huntington ND, Davis MJ. A gene signature predicting natural killer cell infiltration and improved survival in melanoma patients. *Cancer Immunology Research* 2019; 7:1162-74.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JWC, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417:949-54.

- De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* 2013; 23:277-86.
- Dhawan P, Richmond A. Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *Journal of Leukocyte Biology* 2002; 72:9-18.
- Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001; 413:165-71.
- Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *American Journal of Pathology* 2003; 163:333-43.
- Du J, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Ross K, Huber WE, Nishimura EK, Golub TR, Fisher DE. Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* 2004; 6:565-76.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 2002; 3:991-8.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology* 2004; 22:329-60.
- Engblom C, Pfirschke C, Pittet MJ. The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nature Reviews: Cancer* 2016; 16:447-62.
- Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, Deacon DH, Shea SM, Dengel LT, Patterson JW, Slingluff CL, Jr. Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer Research* 2012; 72:1070-80.
- Feige E, Yokoyama S, Levy C, Khaled M, Igras V, Lin RJ, Lee S, Widlund HR, Granter SR, Kung AL, Fisher DE. Hypoxia-induced transcriptional repression of the melanoma-associated oncogene MITF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108:E924-33.
- Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov LV, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, Dummer R, Trefzer U, Larkin JM, Utikal J, Dreno B, Nyakas M, Middleton MR, Becker JC, Casey M, Sherman LJ, Wu FS, Ouellet D, Martin AM, Patel K, Schadendorf D, Group MS. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *New England Journal of Medicine* 2012; 367:107-14.
- Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *Journal of Immunology* 2007; 178:5245-52.
- Frederick DT, Piris A, Cogdill AP, Cooper ZA, Lezcano C, Ferrone CR, Mitra D, Boni A, Newton LP, Liu C, Peng W, Sullivan RJ, Lawrence DP, Hodi FS, Overwijk WW, Lizee G, Murphy GF, Hwu P, Flaherty KT, Fisher DE, Wargo JA. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research* 2013; 19:1225-31.
- Freeman-Keller M, Kim Y, Cronin H, Richards A, Gibney G, Weber JS. Nivolumab in resected and unresectable metastatic melanoma: characteristics of immune-related adverse events and association with outcomes. *Clinical Cancer Research* 2016; 22:886-94.

Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome.  
*Nature Reviews: Cancer* 2012; 12:298-306.

Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies.  
*Nature Reviews Drug Discovery* 2019; 18:197-218.

Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhir R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub TR, Rimm DL, Meyerson ML, Fisher DE, Sellers WR. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma.  
*Nature* 2005; 436:117-22.

Giuliano S, Cheli Y, Ohanna M, Bonet C, Beuret L, Bille K, Loubat A, Hofman V, Hofman P, Ponzio G, Bahadoran P, Ballotti R, Bertolotto C. Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas.  
*Cancer Research* 2010; 70:3813-22.

Green MR. Targeting Targeted Therapy.  
*New England Journal of Medicine* 2004; 350:2191-3.

Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity.  
*Annual Review of Immunology* 2014; 32:659-702.

Griss J, Bauer W, Wagner C, Simon M, Chen M, Grabmeier-Pfistershammer K, Maurer-Granofszky M, Roka F, Penz T, Bock C, Zhang G, Herlyn M, Glatz K, Laubli H, Mertz KD, Petzelbauer P, Wiesner T, Hartl M, Pickl WF, Somasundaram R, Steinberger P, Wagner SN. B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma.  
*Nature Communications* 2019; 10:4186.

Haass NK, Beaumont KA, Hill DS, Anfosso A, Mrass P, Munoz MA, Kinjyo I, Weninger W. Real-time cell cycle imaging during melanoma growth, invasion, and drug response.  
*Pigment Cell Melanoma Research* 2014; 27:764-76.

Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity.  
*Nature Reviews: Immunology* 2008; 8:533-44.

Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment.  
*Cancer Cell* 2012; 21:309-22.

Haq R, Yokoyama S, Hawryluk EB, Jonsson GB, Frederick DT, McHenry K, Porter D, Tran TN, Love KT, Langer R, Anderson DG, Garraway LA, Duncan LM, Morton DL, Hoon DS, Wargo JA, Song JS, Fisher DE. BCL2A1 is a lineage-specific antiapoptotic melanoma oncogene that confers resistance to BRAF inhibition.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; 110:4321-6.

Harlin H, Kuna TV, Peterson AC, Meng Y, Gajewski TF. Tumor progression despite massive influx of activated CD8<sup>(+)</sup> T cells in a patient with malignant melanoma ascites.  
*Cancer Immunology, Immunotherapy* 2006; 55:1185-97.

Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, McKee M, Gajewski TF. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8<sup>+</sup> T-cell recruitment.  
*Cancer Research* 2009; 69:3077-85.

Hartman ML, Czyz M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity.  
*Cellular and Molecular Life Sciences* 2015; 72:1249-60.

Hartman ML, Czyz M. Pro-survival role of MITF in melanoma.  
*Journal of Investigative Dermatology* 2015; 135:352-8.

Hauschild A, Grob J-J, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, Rutkowski P, Blank CU, Miller WH, Kaempgen E, Martín-Algarra S, Karaszewska B, Mauch C, Chiarion-Sileni V, Martin A-M, Swann S, Haney P, Mirakhur B, Guckert ME, Goodman V, Chapman PB. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial.  
*The Lancet* 2012; 380:358-65.

Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy.  
*Nature Reviews: Cancer* 2019; 19:133-50.

Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension.  
*Nature Protocols* 2007; 2:924-32.

Hemesath TJ, Price ER, Takemoto C, Badalian T, Fisher DE. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes.  
*Nature* 1998; 391:298-301.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Uria WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.  
*New England Journal of Medicine* 2010; 363:711-23.

Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Dobbeling U, Kobert N, Schaerer L, Hemmi S, Dummer R. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states.  
*Cancer Research* 2008; 68:650-6.

Hua C, Boussemart L, Mateus C, Routier E, Boutros C, Cazenave H, Viollet R, Thomas M, Roy S, Benannoune N, Tomasic G, Soria J-C, Champiat S, Texier M, Lanoy E, Robert C. Association of vitiligo with tumor response in patients with metastatic melanoma treated with pembrolizumab.  
*JAMA Dermatology* 2016; 152:45-51.

Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors.  
*The FEBS Journal* 2018; 285:2944-71.

Hwang J, Kim CW, Son KN, Han KY, Lee KH, Kleinman HK, Ko J, Na DS, Kwon BS, Gho YS, Kim J. Angiogenic activity of human CC chemokine CCL15 in vitro and in vivo.  
*FEBS Letters* 2004; 570:47-51.

Inoue S, Leitner WW, Golding B, Scott D. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity.  
*Cancer Research* 2006; 66:7741-7.

Jäger E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F, Knuth A. Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8<sup>+</sup> cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo.  
*International Journal of Cancer* 1996; 66:470-6.

Johannessen CM, Johnson LA, Piccioni F, Townes A, Frederick DT, Donahue MK, Narayan R, Flaherty KT, Wargo JA, Root DE, Garraway LA. A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition.  
*Nature* 2013; 504:138-42.

Ju RJ, Stehbens SJ, Haass NK. The role of melanoma cell-stroma interaction in cell motility, invasion, and metastasis.  
*Frontiers in Medicine* 2018; 5:307.

Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T, Rosenberg SA. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91:3515-9.

Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Sakaguchi K, Appella E, Yannelli JR, Adema GJ, Miki T, Rosenberg SA. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91:6458-62.

Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nature Immunology* 2002; 3:999-1005.

Khong HT, Wang QJ, Rosenberg SA. Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *Journal of Immunotherapy* 2004; 27:184-90.

Kitamura T, Qian BZ, Soong D, Cassetta L, Noy R, Sugano G, Kato Y, Li J, Pollard JW. CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 2015; 212:1043-59.

Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayyeh O, Kim JW, Cooper ZA, Piris A, Frederick DT, Barzily-Rokni M, Straussman R, Haq R, Fisher DE, Mesirov JP, Hahn WC, Flaherty KT, Wargo JA, Tamayo P, Garraway LA. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discovery* 2014; 4:816-27.

Krieg C, Nowicka M, Guglietta S, Schindler S, Hartmann FJ, Weber LM, Dummer R, Robinson MD, Levesque MP, Becher B. High-dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. *Nature Medicine* 2018; 24:144-53.

Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, Brumlik M, Cheng P, Curiel T, Myers L, Lackner A, Alvarez X, Ochoa A, Chen L, Zou W. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *Journal of Experimental Medicine* 2006; 203:871-81.

Kuang DM, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang JP, Wu C, Zheng L. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *Journal of Experimental Medicine* 2009; 206:1327-37.

Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, Bald T, Rogava M, Cron M, Fatho M, Lennerz V, Wolfel T, Holzel M, Tuting T. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* 2012; 490:412-6.

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, Carlino MS, Haanen JB, Maio M, Marquez-Rodas I, McArthur GA, Ascierto PA, Long GV, Callahan MK, Postow MA, Grossmann K, Sznol M, Dreno B, Bastholt L, Yang A, Rollin LM, Horak C, Hodi FS, Wolchok JD. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *New England Journal of Medicine* 2015; 373:23-34.

LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008; 112:1570-80.

Lee JH, Shklovskaya E, Lim SY, Carlino MS, Menzies AM, Stewart A, Pedersen B, Irvine M, Alavi S, Yang JYH, Strbenac D, Saw RPM, Thompson JF, Wilmott JS, Scolyer RA, Long GV, Kefford RF, Rizos H. Transcriptional downregulation of MHC class I and melanoma de-differentiation in resistance to PD-1 inhibition. *Nature Communications* 2020; 11:1897.



Lee S, Heinrich EL, Li L, Lu J, Choi AH, Levy RA, Wagner JE, Yip ML, Vaidehi N, Kim J. CCR9-mediated signaling through  $\beta$ -catenin and identification of a novel CCR9 antagonist. *Molecular Oncology* 2015; 9:1599-611.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Kurzversion 3.2, 2019, AWMF Registernummer: 032/024OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/> (abgerufen am: 11.07.2020).

Lennerz V, Fatho M, Gentilini C, Frye RA, Lifke A, Ferel D, Wolfel C, Huber C, Wolfel T. The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102:16013-8.

Letsch A, Keilholz U, Schadendorf D, Assfalg G, Asemissen AM, Thiel E, Scheibenbogen C. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. *Journal of Investigative Dermatology* 2004; 122:685-90.

Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in Molecular Medicine* 2006; 12:406-14.

Lin L, Chen Y-S, Yao Y-D, Chen J-Q, Chen J-N, Huang S-Y, Zeng Y-J, Yao H-R, Zeng S-H, Fu Y-S, Song E-W. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in breast cancer. *Oncotarget* 2015; 6:34758-73.

Liu F, Fu Y, Meyskens FL, Jr. MITF regulates cellular response to reactive oxygen species through transcriptional regulation of APE-1/Ref-1. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; 129:422-31.

Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Grob JJ, Chiarion Sileni V, Lebbe C, Mandalà M, Millward M, Arance A, Bondarenko I, Haanen JB, Hansson J, Utikal J, Ferraresi V, Kovalenko N, Mohr P, Probst A, Schadendorf D, Nathan P, Robert C, Ribas A, DeMarini DJ, Irani JG, Casey M, Ouellet D, Martin AM, Le N, Patel K, Flaherty K. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *New England Journal of Medicine* 2014; 371:1877-88.

Luan J, Shattuck-Brandt R, Haghnegahdar H, Owen JD, Strieter R, Burdick M, Nirodi C, Beauchamp D, Johnson KN, Richmond A. Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGS/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *Journal of Leukocyte Biology* 1997; 62:588-97.

Luster AD, Leder P. IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 1993; 178:1057-65.

Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nature Immunology* 2001; 2:102-7.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 2002; 23:549-55.

McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, Lin YL, Ramaswamy S, Avery W, Ding HF, Jordan SA, Jackson IJ, Korsmeyer SJ, Golub TR, Fisher DE. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* 2002; 109:707-18.

Meeth K, Wang JX, Micevic G, Damsky W, Bosenberg MW. The YUMM lines: a series of congenic mouse melanoma cell lines with defined genetic alterations. *Pigment Cell Melanoma Research* 2016; 29:590-7.

Mgrditchian T, Arakelian T, Paggetti J, Noman MZ, Viry E, Moussay E, Van Moer K, Kreis S, Guerin C, Buart S, Robert C, Borg C, Vielh P, Chouaib S, Berchem G, Janji B. Targeting autophagy inhibits melanoma growth by enhancing NK cells infiltration in a CCL5-dependent manner.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2017; 114:E9271-E9.

Mok S, Koya RC, Tsui C, Xu J, Robert L, Wu L, Graeber T, West BL, Bollag G, Ribas A. Inhibition of CSF-1 receptor improves the antitumor efficacy of adoptive cell transfer immunotherapy.

*Cancer Research* 2014; 74:153-61.

Morton DL, Eilber FR, Holmes EC, Hunt JS, Ketcham AS, Silverstein MJ, Sparks FC. BCG immunotherapy of malignant melanoma: summary of a seven-year experience.

*Annals of Surgery* 1974; 180:635-43.

Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks.

*Nature Reviews: Cancer* 2016; 16:7-19.

Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis.

*Nature* 2001; 410:50-6.

Muller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, Kong X, Possik PA, Cornelissen-Steijger PD, Geukes Foppen MH, Kemper K, Goding CR, McDermott U, Blank C, Haanen J, Graeber TG, Ribas A, Lo RS, Peeper DS. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma.

*Nature Communications* 2014; 5:5712.

Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy.

*Nature Reviews: Immunology* 2017; 17:559-72.

Nakayama Y, Nagashima N, Minagawa N, Inoue Y, Katsuki T, Onitsuka K, Sako T, Hirata K, Nagata N, Itoh H. Relationships between tumor-associated macrophages and clinicopathological factors in patients with colorectal cancer.

*Anticancer Research* 2002; 22:4291-6.

Nelson BH. CD20<sup>+</sup> B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes.

*Journal of Immunology* 2010; 185:4977-82.

Neubert NJ, Schmittnaegel M, Bordry N, Nassiri S, Wald N, Martignier C, Tillé L, Homicsko K, Damsky W, Maby-El Hajjami H, Klamann I, Danenberg E, Ioannidou K, Kandalaft L, Coukos G, Hoves S, Ries CH, Fuertes Marraco SA, Foukas PG, De Palma M, Speiser DE. T cell-induced CSF1 promotes melanoma resistance to PD1 blockade.

*Science Translational Medicine* 2018; 10:eaan3311.

Ohanna M, Giuliano S, Bonet C, Imbert V, Hofman V, Zangari J, Bille K, Robert C, Bressac-de Paillerets B, Hofman P, Rocchi S, Peyron JF, Lacour JP, Ballotti R, Bertolotto C. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- $\kappa$ B-associated secretome (PNAS).

*Genes and Development* 2011; 25:1245-61.

Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer.

*Journal of Leukocyte Biology* 2019; 106:309-22.

Payne AS, Cornelius LA. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis.

*Journal of Investigative Dermatology* 2002; 118:915-22.

Pirozian MR, McGuire HM, Emran AA, Tseng HY, Tiffen JC, Lee JH, Carlino MS, Menzies AM, Long GV, Scolyer RA, Fazekas de St Groth B, Hersey P. Pretreatment innate cell populations and CD4 T cells in blood are associated with response to immune checkpoint blockade in melanoma patients.

*Frontiers in Immunology* 2020; 11:372.

Pitt JM, Marabelle A, Eggermont A, Soria JC, Kroemer G, Zitvogel L. Targeting the tumor microenvironment: removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy. *Annals of Oncology* 2016; 27:1482-92.

Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews: Cancer* 2004; 4:71-8.

Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *New England Journal of Medicine* 2018; 378:158-68.

Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, Olson OC, Quick ML, Huse JT, Teijeiro V, Setty M, Leslie CS, Oei Y, Pedraza A, Zhang J, Brennan CW, Sutton JC, Holland EC, Daniel D, Joyce JA. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nature Medicine* 2013; 19:1264-72.

Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA, Pollard JW. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011; 475:222-5.

Ribas A, Lawrence D, Atkinson V, Agarwal S, Miller WH, Jr., Carlino MS, Fisher R, Long GV, Hodi FS, Tsoi J, Grasso CS, Mookerjee B, Zhao Q, Ghorri R, Moreno BH, Ibrahim N, Hamid O. Combined BRAF and MEK inhibition with PD-1 blockade immunotherapy in BRAF-mutant melanoma. *Nature Medicine* 2019; 25:936-40.

Riesenberg S, Groetchen A, Siddaway R, Bald T, Reinhardt J, Smorra D, Kohlmeyer J, Renn M, Phung B, Aymans P, Schmidt T, Hornung V, Davidson I, Goding CR, Jonsson G, Landsberg J, Tuting T, Holzel M. MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. *Nature Communications* 2015; 6:8755.

Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, Lichinitser M, Dummer R, Grange F, Mortier L, Chiarion-Sileni V, Drucis K, Krajsova I, Hauschild A, Lorigan P, Wolter P, Long GV, Flaherty K, Nathan P, Ribas A, Martin AM, Sun P, Crist W, Legos J, Rubin SD, Little SM, Schadendorf D. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *New England Journal of Medicine* 2015; 372:30-9.

Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, Daud A, Carlino MS, McNeil C, Lotem M, Larkin J, Lorigan P, Neyns B, Blank CU, Hamid O, Mateus C, Shapira-Frommer R, Kosh M, Zhou H, Ibrahim N, Ebbinghaus S, Ribas A. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *New England Journal of Medicine* 2015; 372:2521-32.

Santos PM, Butterfield LH. Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines. *Journal of Immunology* 2018; 200:443-9.

Sarvaria A, Madrigal JA, Saudemont A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cellular & Molecular Immunology* 2017; 14:662-74.

Saudemont A, Jouy N, Hetuin D, Quesnel B. NK cells that are activated by CXCL10 can kill dormant tumor cells that resist CTL-mediated lysis and can express B7-H1 that stimulates T cells. *Blood* 2005; 105:2428-35.

Seidl H, Richtig E, Tilz H, Stefan M, Schmidbauer U, Asslaber M, Zatloukal K, Herlyn M, Schaidt H. Profiles of chemokine receptors in melanocytic lesions: de novo expression of CXCR6 in melanoma. *Human Pathology* 2007; 38:768-80.

Shabaneh TB, Molodtsov AK, Steinberg SM, Zhang P, Torres GM, Mohamed GA, Boni A, Curiel TJ, Angeles CV, Turk MJ. Oncogenic BRAF(V600E) governs regulatory T-cell recruitment during melanoma tumorigenesis.

*Cancer Research* 2018; 78:5038-49.

Shebl FM, Pinto LA, Garcia-Pineros A, Lempicki R, Williams M, Harro C, Hildesheim A. Comparison of mRNA and protein measures of cytokines following vaccination with human papillomavirus-16 L1 virus-like particles. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2010; 19:978-81.

Smalley KS, Contractor R, Nguyen TK, Xiao M, Edwards R, Muthusamy V, King AJ, Flaherty KT, Bosenberg M, Herlyn M, Nathanson KL. Identification of a novel subgroup of melanomas with KIT/cyclin-dependent kinase-4 overexpression. *Cancer Research* 2008; 68:5743-52.

Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2:850-61.

Somasundaram R, Zhang G, Fukunaga-Kalabis M, Perego M, Krepler C, Xu X, Wagner C, Hristova D, Zhang J, Tian T, Wei Z, Liu Q, Garg K, Griss J, Hards R, Maurer M, Hafner C, Mayerhofer M, Karanikas G, Jalili A, Bauer-Pohl V, Weihsengruber F, Rappersberger K, Koller J, Lang R, Hudgens C, Chen G, Tetzlaff M, Wu L, Frederick DT, Scolyer RA, Long GV, Damle M, Ellingsworth C, Grinman L, Choi H, Gavin BJ, Dunagin M, Raj A, Scholler N, Gross L, Beqiri M, Bennett K, Watson I, Schaidler H, Davies MA, Wargo J, Czerniecki BJ, Schuchter L, Herlyn D, Flaherty K, Herlyn M, Wagner SN. Tumor-associated B-cells induce tumor heterogeneity and therapy resistance. *Nature Communications* 2017; 8:607.

Song JK, Park MH, Choi DY, Yoo HS, Han SB, Yoon DY, Hong JT. Deficiency of C-C chemokine receptor 5 suppresses tumor development via inactivation of NF-kappaB and upregulation of IL-1Ra in melanoma model. *PloS One* 2012; 7:e33747.

Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 2015; 523:231-5.

Stansfield BK, Ingram DA. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clinical and Translational Medicine* 2015; 4:5.

Taskinen M, Karjalainen-Lindsberg ML, Nyman H, Eerola LM, Leppa S. A high tumor-associated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide-doxorubicin-vincristine-prednisone. *Clinical Cancer Research* 2007; 13:5784-9.

Teulings HE, Limpens J, Jansen SN, Zwinderman AH, Reitsma JB, Spuls PI, Luiten RM. Vitiligo-like depigmentation in patients with stage III-IV melanoma receiving immunotherapy and its association with survival: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology* 2015; 33:773-81.

Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *The Yale journal of biology and medicine* 1982; 55:329-33.

Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH, Treacy D, Trombetta JJ, Rotem A, Rodman C, Lian C, Murphy G, Fallahi-Sichani M, Dutton-Regester K, Lin J-R, Cohen O, Shah P, Lu D, Genshaft AS, Hughes TK, Ziegler CGK, Kazer SW, Gaillard A, Kolb KE, Villani A-C, Johannessen CM, Andreev AY, Van Allen EM, Bertagnolli M, Sorger PK, Sullivan RJ, Flaherty KT, Frederick DT, Jané-Valbuena J, Yoon CH, Rozenblatt-Rosen O, Shalek AK, Regev A, Garraway LA. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 2016; 352:189.

Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2019; 16:356-71.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *New England Journal of Medicine* 2012; 366:2443-54.

Topalian SL, Rivoltini L, Mancini M, Markus NR, Robbins PF, Kawakami Y, Rosenberg SA. Human CD4<sup>+</sup> T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91:9461.

Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: Possible involvement of TNF $\alpha$  and IL-1 $\alpha$ . *International Journal of Cancer* 2000; 85:182-8.

Tu Z, Xiao R, Xiong J, Tembo KM, Deng X, Xiong M, Liu P, Wang M, Zhang Q. CCR9 in cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Journal of Hematology & Oncology* 2016; 9:10.

Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C, Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014; 515:568-71.

van den Broek MF, Kägi D, Zinkernagel RM, Hengartner H. Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. *European Journal of Immunology* 1995; 25:3514-6.

Van Overmeire E, Stijlemans B, Heymann F, Keirsse J, Morias Y, Elkrim Y, Brys L, Abels C, Lahmar Q, Ergen C, Vereecke L, Tacke F, De Baetselier P, Van Ginderachter JA, Laoui D. M-CSF and GM-CSF receptor signaling differentially regulate monocyte maturation and macrophage polarization in the tumor microenvironment. *Cancer Research* 2016; 76:35-42.

Villanueva J, Herlyn M. Melanoma and the tumor microenvironment. *Current Oncology Reports* 2008; 10:439-46.

Walia V, Mu EW, Lin JC, Samuels Y. Delving into somatic variation in sporadic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Research* 2012; 25:155-70.

Weber JS, Hodi FS, Wolchok JD, Topalian SL, Schadendorf D, Larkin J, Sznol M, Long GV, Li H, Waxman IM, Jiang J, Robert C. Safety profile of nivolumab monotherapy: a pooled analysis of patients with advanced melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2016; 35:785-92.

Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 2004; 5:875-85.

Wellbrock C, Marais R. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *Journal of Cell Biology* 2005; 170:703-8.

Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, Springer CJ, Marais R. V599E B-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Research* 2004; 64:2338.

- Wellbrock C, Rana S, Paterson H, Pickersgill H, Brummelkamp T, Marais R. Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PloS One* 2008; 3:e2734.
- Wendel M, Galani IE, Suri-Payer E, Cerwenka A. Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands. *Cancer Research* 2008; 68:8437-45.
- Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 2008; 27:5904-12.
- Widlund HR, Horstmann MA, Price ER, Cui J, Lessnick SL, Wu M, He X, Fisher DE. Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *Journal of Cell Biology* 2002; 158:1079-87.
- Widmer DS, Hoek KS, Cheng PF, Eichhoff OM, Biedermann T, Raaijmakers MIG, Hemmi S, Dummer R, Levesque MP. Hypoxia contributes to melanoma heterogeneity by triggering HIF1alpha-dependent phenotype switching. *Journal of Investigative Dermatology* 2013; 133:2436-43.
- Wiedemann GM, Aithal C, Kraechan A, Heise C, Cadilha BL, Zhang J, Duester P, Ballotti R, Endres S, Bertolotto C, Kobold S. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) regulates immune cell migration into melanoma. *Translational Oncology* 2019; 12:350-60.
- Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Wagstaff J, Schadendorf D, Ferrucci PF, Smylie M, Dummer R, Hill A, Hogg D, Haanen J, Carlino MS, Bechter O, Maio M, Marquez-Rodas I, Guidoboni M, McArthur G, Lebbé C, Ascierto PA, Long GV, Cebon J, Sosman J, Postow MA, Callahan MK, Walker D, Rollin L, Bhore R, Hodi FS, Larkin J. Overall survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *New England Journal of Medicine* 2017; 377:1345-56.
- Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunologic Research* 2012; 53:41-57.
- Wu M, Hemesath TJ, Takemoto CM, Horstmann MA, Wells AG, Price ER, Fisher DZ, Fisher DE. c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes and Development* 2000; 14:301-12.
- Xu Y, Liu L, Qiu X, Liu Z, Li H, Li Z, Luo W, Wang E. CCL21/CCR7 prevents apoptosis via the ERK pathway in human non-small cell lung cancer cells. *PloS One* 2012; 7:e33262.
- Yasumoto K, Yokoyama K, Shibata K, Tomita Y, Shibahara S. Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Molecular and Cellular Biology* 1994; 14:8058.
- Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut: Malignes Melanom der Haut. Letzte Aktualisierung: 17.12.2019, Abrufdatum: 11.07.2020.
- Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, Zhao YW, Wei YQ. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PloS One* 2012; 7:e50946.
- Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, Nywening TM, West BL, Luo J, Wang-Gillam A, Goedegebuure SP, Linehan DC, DeNardo DG. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models.

*Cancer Research* 2014; 74:5057-69.

Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited.  
*Immunity* 2012; 36:705-16.

Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance.  
*Nature Reviews: Cancer* 2005; 5:263-74.

Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy.  
*Nature Reviews: Immunology* 2006; 6:295-307.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 11 Abkürzungsverzeichnis

<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>	<b>MART-1</b>	<i>Melanoma antigen recognized by T cells 1</i>
<b>BCG</b>	<i>Bacillus Calmette-Guerin</i>	<b>MDA</b>	<i>Melanozytäre Differenzierungsantigene</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovines Serum Albumin</i>	<b>MDSC</b>	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
<b>CCL</b>	<i>CC-Motiv-Chemokinligand</i>	<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>CCR</b>	<i>CC-Motiv-Chemokinrezeptor</i>	<b>MITF</b>	<i>Microphthalmia-associated transcription factor</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>	<b>NK-Zellen</b>	<i>Natürliche Killer-Zellen</i>
<b>cDNA</b>	<i>copyDNA</i>	<b>PBMC</b>	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
<b>CSF1-R</b>	<i>CSF1-Rezeptor</i>	<b>PBS</b>	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
<b>CTLA4</b>	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4</i>	<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>CX3CL</b>	<i>CX3C-Motiv-Chemokinligand</i>	<b>PD1</b>	<i>Programmed cell death protein 1</i>
<b>CX3CR</b>	<i>CX3C-Motiv-Chemokinrezeptor</i>	<b>PDL1</b>	<i>Programmed cell death protein ligand 1</i>
<b>CXCL</b>	<i>CXC-Motiv-Chemokinligand</i>	<b>q-RT-PCR</b>	<i>Quantitative realtime PCR</i>
<b>CXCR</b>	<i>CXC-Motiv-Chemokinrezeptor</i>	<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>DC</b>	<i>Dendritische Zellen</i>	<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memory Institute</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified Eagles medium</i>	<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<b>DMSO</b>	<i>Dimethylsulfoxid</i>	<b>SDS-PAGE</b>	<i>SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese</i>
<b>DNA</b>	<i>Desoxyribonucleic acid</i>	<b>SEM</b>	<i>Standard error of mean</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>	<b>TAM</b>	<i>Tumor-assoziierten Makrophagen</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>	<b>TCGA</b>	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<b>FCS</b>	<i>Fetales Kälberserum</i>	<b>TEMED</b>	<i>Teramethylethylendiamin</i>
<b>FoxP3</b>	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>	<b>TGF</b>	<i>Transforming growth factor</i>
<b>GAPDH</b>	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>	<b>TIL</b>	<i>Tumor-infiltrierender Lymphozyten</i>
<b>GFP</b>	<i>Grün-fluoreszierendes Protein</i>	<b>T<sub>reg</sub></b>	<i>Regulatorische T-Zellen</i>
<b>gp</b>	<i>Glykoprotein</i>	<b>TZR</b>	<i>T-Zell-Rezeptor</i>
<b>HPRT</b>	<i>Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase</i>	<b>UICC</b>	<i>Union internationale contre le cancer</i>
<b>HRP</b>	<i>Horseradish-Peroxidase</i>	<b>UV-Strahlung</b>	<i>Ultraviolette Strahlung</i>
<b>IL</b>	<i>Interleukin</i>	<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>irAE</b>	<i>Immune related adverse events</i>	<b>VLE-RPMI</b>	<i>Very Low Endotoxine RPMI</i>
<b>M-CSF</b>	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>	<b>XCL</b>	<i>XC-Motiv-Chemokinligand</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen activated pathway-kinase</i>	<b>XCR</b>	<i>XC-Motiv-Chemokinrezeptor</i>

## 8 Veröffentlichung

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in gleicher oder ähnlicher Darstellung in der internationalen Fachzeitschrift *Translational Oncology* als Originalarbeit veröffentlicht.

Wiedemann GM\*, **Aithal C\***, Kraechan A, Heise C, Cadilha BL, Zhang J, Duewell P, Ballotti R, Endres S, Bertolotto C, Kobold S. Microphthalmia-associated transcription Factor (MITF) regulates immune cell migration into melanoma.

*Translational Oncology* 2019; 12:350-60.

JIF (2019); 3,3.

\* Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.



## 9 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Sebastian Kobold und Prof. Stefan Endres bedanken, dass ich meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe machen konnte. Durch das tolle Team und die enorme Hilfsbereitschaft von allen Kollegen wurde das Laborleben um ein Vielfaches leichter gemacht. Danke für die Unterstützung während der Arbeit und die kontinuierliche und hilfreiche Auseinandersetzung mit den Daten. Danke für die tollen Möglichkeiten, die ihr geschaffen habt, auf große internationale Konferenzen zu fahren, solche selbst zu organisieren, exzellente Wissenschaftler und nicht zuletzt wunderbare Menschen kennenzulernen. Ein Teil der KlinPharm-Familie zu sein wird für mich immer etwas Besonderes bleiben. Durch das Labor habe ich nicht nur fachlich sehr viel wachsen können, sondern konnte auch viel lernen, was mir noch mein Leben lang nützlich sein wird. All das wäre ohne euch nicht möglich gewesen.

Außerdem möchte ich Gabi, Jin, Anamarija, Julia, Angelina und Constanze danken, die den Grundstein für mein Projekt gelegt haben, mich geduldig und mit Witz in die Laborarbeit eingearbeitet haben und durch deren Hilfe ich mein erstes Paper publizieren konnte.

Ganz besonders möchte ich Bruno und Stoiber meinen außerordentlichen Dank ausdrücken, ohne die diese Arbeit nicht das geworden wäre, was sie ist. Zu jeder Zeit standet ihr mir mit Rat und Tat zur Seite. Ihr habt mich gepusht, besser zu werden, härter zu arbeiten, mehr zu lernen, und durchzuhalten – und mir gleichzeitig gezeigt, wie viel Spaß man dabei haben kann. Bruno – Danke für all deine Hilfe, Geduld, unendliche Erklärungen und Tipps, und dass ich wusste, dass ich jederzeit fragen kann. Stoiber – Danke für dein Feedback, dass du an mich geglaubt hast und dass du mir gezeigt hast, was alles dazugehört.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich immer unterstützt hat und mir zur Seite stand und mir Erholung verschafft hat, wann immer ich sie gebraucht habe, bei der ich auftanken konnte. Danke, dass ihr immer für mich da seid.